

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES BIOMÉDICALES ET PHARMACEUTIQUES

Modifications enzymatiques au cours du vieillissement des cellules en culture

Mise en évidence du mécanisme d'altération de la glucose - 6 -phosphate deshydrogenase

Houben, Anne

Award date:
1981

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Facultés Universitaires
Notre Dame de la Paix
Namur

Laboratoire de Biochimie Cellulaire
Promoteur : Professeur J. REMACLE

**MODIFICATIONS ENZYMATIQUES AU COURS DU
VIEILLISSEMENT DES CELLULES EN CULTURE .
MISE EN EVIDENCE DU MECANISME D'ALTERATION DE
LA GLUCOSE - 6 - PHOSPHATE DESHYDROGENASE .**

par

Anne HOUBEN

Thèse présentée en vue de
l'obtention du grade de
Docteur en Sciences

BUMP



0 0 1 7 1 1 1 4 4

*FT B11/1981/01B

1981

FT B3/1981/1

FACULTES
UNIVERSITAIRES
N.-D. DE LA PAIX
NAMUR

Bibliothèque

FT B3

1981/1

Facultés Universitaires
Notre Dame de la Paix
Namur

Laboratoire de Biochimie Cellulaire

Promoteur : Professeur J. REMACLE

**MODIFICATIONS ENZYMATIQUES AU COURS DU
VIEILLISSEMENT DES CELLULES EN CULTURE .
MISE EN EVIDENCE DU MECANISME D'ALTERATION DE
LA GLUCOSE - 6 - PHOSPHATE DESHYDROGENASE .**

par

Anne HOUBEN

Thèse présentée en vue de
l'obtention du grade de
Docteur en Sciences

93253

LB S 171114h

"La recherche ne trouve sa finalité qu'à travers un travail d'équipe et d'étroite collaboration..."

Je tiens donc à dédier cette thèse à tous ceux quî, de près ou de loin, y ont participé et en ont permis l'élaboration.

Ma très profonde gratitude va à
Monsieur le Professeur Remacle, qui m'a permis de
réaliser mon doctorat, qui m'a judicieusement guidée,
aidée de ses conseils et orientée dans la recherche.

Je me dois de remercier :

Madame Andrée Houbion pour sa collaboration constante
et efficace : elle n'a ménagé ni son temps, ni son
dévouement;

Mademoiselle Martine Raes pour les nombreuses
suggestions qu'elle m'a prodiguées et l'assistance
qu'elle m'a apportée pour l'élaboration de ce
manuscrit;

Monsieur Edouard Delaive pour son aide technique
et sa constante disponibilité.

Mes remerciements vont également :

- à Monsieur le Professeur Wattiaux pour l'intérêt qu'il a manifesté à l'égard de mon travail
- à Monsieur Francis Mainferme pour ses conseils tant scientifiques que techniques
- à Monsieur Jean-Marie Van Dyck, Madame Jacqueline Thirion et Madame le Professeur Ronveaux qui m'ont apporté leur appui dans les moments difficiles
- à Monsieur Axel Kahn et Madame Dominique Cattreau qui m'ont accueillie dans leur laboratoire et initiée aux techniques de purification de la glucose-6-phosphate déshydrogénase
- à Madame Annick Genette, Monsieur Eric Depiereux et Monsieur le Professeur Feytmans pour l'interprétation statistique de mes résultats
- à Monsieur le Professeur Schöfflers pour ses nombreuses suggestions et ses encouragements dans l'élaboration de la thèse annexe.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à l'aboutissement de cette thèse : Monsieur Michel Somville, Madame Marie Burgos, Monsieur Franz Dubois, Madame Gyselle Henrard, Monsieur Bauduin Lotin, Madame Claudine Petitjean, tous les membres des départements de Biochimie Cellulaire et de Chimie Physiologique et tous ceux qui m'ont entourée de leur amitié.

Je voudrais enfin remercier l'I.R.S.I.A. et les Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix qui m'ont assistée financièrement et m'ont permis de mener à bien ma recherche.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I. OBJECTIF GENERAL DU TRAVAIL

II. DEFINITION DU VIEILLISSEMENT

III. VIEILLISSEMENT DES CELLULES IN VITRO

IV. RELATION ENTRE LE VIEILLISSEMENT IN VIVO ET LE VIEILLISSEMENT IN VITRO

V. TRANSPLANTATIONS SERIEES DE TISSUS IN VIVO

VI. MODIFICATIONS LIEES AU VIEILLISSEMENT

- a) Modifications morphologiques et cytologiques
- b) Modifications physiologiques et biochimiques

VII. AGENTS CAPABLES D'AUGMENTER LA VIE DES CELLULES IN VITRO

VIII. THEORIES DU VIEILLISSEMENT

- a) Théories du vieillissement programmé
 - 1. Théorie du "codon restriction"
 - 2. Théorie de la régulation des gènes
- b) Théories de l'erreur
 - 1. Théorie des mutations somatiques
 - 2. Théorie des radicaux libres
 - 3. Théorie de l'erreur catastrophique

IX. VERIFICATION DE LA THEORIE DE L'ERREUR CATASTROPHIQUE

- a) Etude d'enzymes appartenant à divers compartiments subcellulaires
- b) Choix des enzymes étudiés

X. MECANISME DE L'ALTERATION DE LA G6PD

Caractérisation de la G6PD

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS

METHODES

I. CULTURE DE CELLULES

- a) Caractérisation des cellules utilisées
- b) Méthode de culture
- c) Mesure du vieillissement de la culture
- d) Congélation - Décongélation des cellules

II. PREPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES

- a) Pour l'étude de la glucose - 6 - phosphate déshydrogénase (G6PD)
- b) Pour l'étude de :
 - la N - acétyl - β - D - glucosaminidase (NA β Glu)
 - l' α - D - glucosidase (α Glu)
 - la N - acétyl - α - D - galactosaminidase (NA α Gal)
 - la sulfite cytochrome c réductase
 - la catalase

III. DOSAGES BIOCHIMIQUES

- a) Méthodes de dosage
- b) Cinétique enzymatique
 - 1. Effet du pH
 - 2. Effet de la concentration en protéines

IV. INACTIVATION DE L'ISOENZYME A DE LA NA β Glu

V. COURBES DE THERMOLABILITE

VI. FRACTIONNEMENT DES CELLULES PAR CENTRIFUGATIONS DIFFE-
RENTIELLES

VII. PURIFICATION DE LA G6PD

- a) Préparation de l'extrait cellulaire
- b) Précipitation au sulfate ammonique
- c) Dialyse
- d) Chromatographie sur carboxyméthyl Séphadex C-50

VIII. ELECTROPHORESE DE LA G6PD

RESULTATS

PREMIERE PARTIE

Thermolabilité d'enzymes appartenant à différents organites subcellulaires chez les fibroblastes WI-38 et WS-HMG

I. ENZYMES DES CELLULES WI-38

II. ENZYMES DES CELLULES WS-HMG

III. CONCLUSIONS

DEUXIEME PARTIE

Etude de l'altération de la G6PD

I. APPARITION IN VITRO D'UNE ALTERATION DE LA G6PD

- a) Chez les cellules jeunes
- b) Chez les cellules vieilles

II. RECHERCHE DE FACTEURS INFLUENCANT L'APPARITION DE L'ALTERATION ET L'ACTIVITE CHEZ LES CELLULES JEUNES

- a) Incubation d'un homogénat de cellules jeunes en présence d'un jus de lysosomes
- b) Incubation d'un homogénat en présence des différentes fractions N, ML, P, S isolées de cellules vieilles
- c) Incubation d'un surnageant en présence d'albumine
- d) Influence du pH
 - 1. Evolution de l'activité de la G6PD lors de son incubation à différents pH.
 - 2. Etude des courbes de thermolabilité de la G6PD après incubation à pH 6,5 et à pH 7,4.

e) Influence du NADP^+

1. Evolution de l'activité de la G6PD lors de son incubation en présence de diverses concentrations en NADP^+
2. Evolution de la thermolabilité de la G6PD en présence de NADP^+
3. Etude du comportement électrophorétique de la G6PD incubée en présence de NADP^+ .

III. REVERSIBILITE DU PHENOMENE D'ALTERATION

a) Etude de la réversibilité de l'altération chez les cellules jeunes

1. Par acidification du milieu d'incubation
2. Par addition de NADP^+ dans le milieu d'incubation

b) Etude de la réversibilité de l'altération chez les cellules vieilles

1. Par acidification du milieu d'incubation
2. Par addition de NADP^+ dans le milieu d'incubation
3. Par modification du pH et addition du NADP^+ dans le milieu d'incubation.

IV. MECANISME D'ALTERATION DE LA G6PD

a) Séparation des différentes formes moléculaires de la G6PD par filtration sur tamis moléculaire.

1. Etalonnage de la colonne et distribution des formes actives de la G6PD
2. Mise en évidence des monomères par leur réactivation en présence de NADP^+
3. Répartition de l'enzyme altéré avant et après incubation en présence de NADP^+

b) Altération et inactivation de la G6PD en tant que réaction consécutive.

DISCUSSION

I. ABSENCE D'ALTERATION D'ENZYMES LYSOSOMIAUX ET MITOCHONDRIAUX EN TANT QU'ARGUMENT CONTRE LA THEORIE RESTRICTIVE DE L'ERREUR CATASTROPHIQUE

II. LES ALTERATIONS ENZYMATIQUES ET LEURS INTERPRETATIONS

- a) Revue des enzymes altérés au cours du vieillissement
- b) Modification de la G6PD au cours du vieillissement
- c) Mécanismes proposés pour les modifications posttraductionnelles.
 - 1. Modifications impliquant l'addition ou l'élimination de groupements sur l'enzyme
 - 2. Modifications impliquant un changement conformationnel

III. L'ALTERATION DE LA G6PD

- a) Apparition in vitro de l'altération de la G6PD
 - 1. Mobilité électrophorétique de l'enzyme altéré
 - 2. Effet de la protéolyse et des organites subcellulaires
 - 3. Effet de l'albumine
 - 4. Protection due au pH
 - 5. Protection par le NADP^+

b) Réversibilité de l'altération

Argument en faveur d'une modification conformationnelle de la G6PD.

c) La G6PD altérée comme intermédiaire au cours de l'inactivation de l'enzyme.

DISCUSSION GENERALE

LISTE DES ABREVIATIONS

CM Séphadex C-50 : carboxymethyl Séphadex C-50

CRM : matériel à réaction croisée

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

EDTA : Ethylène Diamine Tétraacétate

G : nombre de passages des cellules en culture

G6PD : Glucose - 6 - Phosphate Déshydrogénase

α Glu : α - D - glucosidase

[³H] dT : thymidine tritiée

IMC : Index Mitotique de Cristofalo

N A α Gal : N - acétyl - α - D - galactosaminidase

N A β Glu : N - acétyl - β - D - glucosaminidase

NADP⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (sel de monosodium)

PBS : "Phosphate Buffer Saline" : tampon phosphate 10 mM pH 7,4 contenant du NaCl 0,15 M

PDL : Population Doubling Level : potentiel de division

Solution A : tampon Tris - HCl 25 mM pH 7,4 contenant du NaCl 0,15 M.

Solution B : tampon Tris - HCl 50 mM pH 8 contenant du 2-mercaptoéthanol 1 mM, de l'EDTA 1 mM, de l'acide Σ -amino-n-caproïque 4 mM et du NADP⁺ 1mM.

Solution I : solution de phosphate de Na 10mM tamponnée à pH 6 contenant du NADP⁺ 5×10^{-5} M, de l'acide Σ -amino-n-caproïque 10^{-3} M, du 2-mercaptoéthanol 10^{-3} M, de l'EDTA 10^{-3} M.

Tris : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

INTRODUCTION

I. OBJECTIF GENERAL DU TRAVAIL

Le but de notre travail était de mieux comprendre le phénomène du vieillissement cellulaire en essayant d'expliquer certaines de ses manifestations qui apparaissent notamment au niveau des enzymes.

Pour ce faire, nous avons entrepris à différents niveaux, une étude biochimique d'enzymes de fibroblastes humains au cours de leur vieillissement in vitro.

II. DEFINITION DU VIEILLISSEMENT

On peut proposer comme définition du vieillissement la perte au cours du temps de l'organisation d'un système biologique au détriment de sa fonction et de sa survie. Il est évident que le vieillissement est un phénomène qui touche l'individu dans sa totalité mais c'est également un phénomène qui se produit au niveau des cellules prises comme entités individuelles.

III. VIEILLISSEMENT DES CELLULES IN VITRO

Pour comprendre la nature et les causes des changements liés au vieillissement in vivo, il était utile de distinguer les modifications intrinsèques à la cellule de celles dues à son environnement.

Un pas dans ce sens a été franchi en maintenant des cellules en culture, c'est-à-dire en dehors de toute influence que pourraient avoir sur elles des modifications survenant à d'autres endroits du corps.

C'est sur un tel système que nous avons réalisé nos recherches.

Carrel et Ebeling (1921) puis Cohn et Murray (1925) furent les premiers à trouver une corrélation entre le comportement des cellules en culture et l'âge de l'individu dont elles proviennent.

Lorsqu'ils mirent des morceaux de tissus embryonnaires en culture in vitro, ils constatèrent qu'il fallait un certain temps, appelé temps de latence, avant que les cellules ne se mettent à migrer à l'extérieur du tissu. Ils mirent en évidence que ce temps de latence était d'autant plus long que le tissu provenait d'individus âgés. Ces résultats ont été confirmés par la suite (Soukupová et Holečková, 1964, Soukupová et al., 1970). Cependant, ils constatèrent aussi que des cellules mises en culture à partir du coeur d'un embryon de poulet avaient un potentiel de division illimité. En effet, ces cellules ont été maintenues en vie durant 34 ans, période de loin supérieure à la durée de vie maximale du poulet (voir Lamb, 1977). Ces résultats laissaient penser que lorsque les cellules ne subissaient plus l'influence et l'interaction de l'environnement corporel, leur potentiel de vie devenait illimité.

Depuis lors, Hayflick et Moorhead, (1961) ont montré que les cellules humaines normales ne pouvaient être maintenues indéfiniment in vitro.

Les cultures de fibroblastes d'embryons humains cessent en effet de se diviser après environ 50 passages (PDL). La mort des cultures est précédée de diverses modifications liées à ce que l'on appellera la sénescence ou le vieillissement

des cellules qui se termine par l'arrêt de la croissance cellulaire.

La mise en culture de cellules a été réalisée sur divers tissus de nombreuses espèces.

Bien que le potentiel de division (PDL) des fibroblastes varie d'une espèce à l'autre (tortue : $PDL = \pm 90$, poulet : $PDL = \pm 25$, homme : $PDL = \pm 50$), et, à l'intérieur d'une espèce, d'un tissu à l'autre (chez l'embryon humain : PDL des cellules rénales = ± 30 , PDL des cellules de foie = ± 25) (Hayflick et Moorhead, 1961, Hayflick, 1965), il est rare que des cellules humaines ou animales acquièrent spontanément une capacité de division illimitée in vitro (pour une revue Macieira-Coelho, 1976, Macieira-Coelho et al., 1977).

C'est pourtant le cas des fibroblastes de souris (Todaro et Green, 1963). Dans ces cultures, les cellules normales, présentes au départ, sont progressivement remplacées par des cellules qui ne possèdent plus les propriétés du tissu d'origine et qui montrent le plus souvent des modifications chromosomiques. Ces lignées "immortelles" de cellules, qui apparaissent spontanément chez la souris, peuvent être obtenues chez l'homme, en infectant des cellules normales avec des virus SV 40 (Girardi et al., 1965) : il s'agit alors de cellules transformées. Ces cellules injectées à des hamsters prolifèrent et font apparaître un cancer chez ces animaux alors que des cellules normales injectées dans les mêmes conditions finissent par disparaître (Hayflick et Moorhead, 1961).

Les expériences de Carrel ne s'expliquent pas apparemment par une transformation des cellules; Hayflick (1965) a suggéré que ces cultures étaient sans cesse "rajeunies" par

l'apport de cellules se trouvant dans le milieu nutritif; celui-ci était constitué d'extraits embryonnaires.

L'arrêt du potentiel de division ne représente qu'un des aspects caractéristiques des cellules en culture. Les cultures de cellules présentent en fait trois phases (Hayflick et Moorhead, 1961).

La phase I est la période de mise en culture : les cellules prélevées du tissu d'origine par des moyens mécaniques ou enzymatiques sont placées dans des boîtes de culture en présence d'un milieu nutritif. Elles vont s'y attacher et former une couche monocellulaire confluyente.

La phase II correspond à une période de division active des cellules. Celles-ci doivent être fréquemment "sous-cultivées" (voir Matériels et Méthodes).

La phase III est caractérisée par l'apparition de nombreuses modifications, la réduction de l'activité mitotique et finalement la dégénérescence et la mort de la culture.

Hayflick et Moorhead, (1961) ont émis l'hypothèse que le vieillissement et la perte du potentiel de division qui caractérise la phase III sont une expression de ce qui se passe lors du vieillissement in vivo.

Le vieillissement des cellules en culture est un phénomène qui n'est pas encore universellement accepté comme tel. De nombreux chercheurs affirment qu'en présence d'un environnement approprié, les cellules seraient capables de se diviser indéfiniment.

Afin de vérifier l'influence du milieu sur le potentiel de division des cellules en culture, Hayflick et Moorhead, 1961, ont mélangé dans une même culture, des fibroblastes jeunes provenant d'un embryon femelle avec des fibroblastes

vieux provenant d'un embryon mâle. Les fibroblastes "mâles" s'arrêtèrent rapidement de se diviser et finirent par disparaître de la culture alors que les fibroblastes "femelles" continuèrent à se diviser normalement. Il est donc improbable qu'un milieu inadéquat, la présence d'un matériel toxique ou pathogène dans le milieu de culture, soient responsables de la mort de cellules vieilles puisque les cellules jeunes continuent à vivre dans ce même environnement. De plus, des différences dans les milieux de culture utilisés dans plusieurs laboratoires ont toujours montré une limite du potentiel de division des cellules. Cette limite semble donc être générale.

En fait, la perte de la capacité de prolifération des cellules ne serait pas l'événement le plus important survenant au cours du vieillissement in vivo. Martin et al. (1970) ont en effet montré que les cellules provenant d'individus âgés gardaient en culture, un potentiel d'environ 20 divisions.

Le vieillissement serait surtout provoqué par les modifications fonctionnelles qui surviennent dans les cellules en culture comme dans les cellules in vivo, avant la perte du potentiel de division. Ce phénomène ultime serait en fait la conséquence du mauvais fonctionnement de la cellule (Hayflick, 1980).

IV. RELATION ENTRE LE VIEILLISSEMENT IN VIVO ET LE VIEILLISSEMENT IN VITRO

Hayflick (1965), fut le premier à montrer que la vie des fibroblastes en culture était déterminée par l'âge chro-

nologique du donneur. En effet, il mit en évidence que des fibroblastes humains provenant d'individus adultes âgés avait un PDL en culture plus faible (de 14 à 29) que celui des fibroblastes provenant d'un embryon (de 35 à 63). Martin et al. (1970) ont établi une relation inverse entre l'âge du donneur et le nombre de divisions des fibroblastes en culture.

En moyenne, le potentiel de division est réduit d'une valeur de 0,2 par année d'âge du donneur. De 45 pour de jeunes enfants âgés de 0 à 10 ans, il passe à une valeur de 25 pour des personnes âgées de 80 à 90 ans.

La vie des cellules humaines en culture semble également fonction du tissu d'origine. Pour des donneurs du même âge, le PDL des cellules osseuses est plus faible que celui des fibroblastes de la peau. Les cellules du muscle squelettique ont quant à elles un comportement intermédiaire. Ces différences sont peut-être dues à l'histoire préalable des cellules in vivo (Martin et al., 1970).

Schneider et Mitsui (1976) ont montré qu'il existait une ressemblance entre les cellules WI-38 vieillissant in vitro et les cellules mises en culture à partir d'individus âgés. Celles-ci se caractérisent comme les cellules WI-38 sénescents par un potentiel de division réduit, une augmentation du volume cellulaire, du temps de division, etc... Les différences observées entre les cellules provenant d'individus vieux et les cellules provenant d'individus jeunes sont cependant moins marquées qu'entre les cellules jeunes et les cellules vieilles in vitro. Toutefois, certaines modifications caractéristiques des "vieux" fibroblastes en culture n'apparaissent pas chez les cellules

d'individus âgés.

Une constatation intéressante a été faite par Martin et al. (1970) sur les fibroblastes provenant de patients atteints de maladies génétiques autosomales : la progérie ou syndrome de Hutchinson-Gilford, et le syndrome de Werner. Ces maladies sont caractérisées par l'apparition d'un vieillissement prématuré s'accompagnant de symptômes typiques tels que le grisonnement et la perte des cheveux, l'atrophie des muscles squelettiques et des testicules, l'apparition de cataracte, d'ulcères de la peau, de diabète etc... L'espérance de vie est de 20 ans pour les individus atteints de progérie et d'environ 45 ans pour ceux qui sont atteints du syndrome de Werner. Le nombre de divisions de leurs cellules en culture est significativement inférieur au nombre de divisions de fibroblastes provenant d'individus normaux ayant le même âge.

Nous savons que chaque espèce animale possède une phase de développement et une durée de vie fixées dans des limites constantes.

Les animaux qui ont une longévité plus courte semblent avoir des fibroblastes qui se divisent moins longtemps in vitro (Hayflick, 1974). Nous avons vu en effet que l'homme qui a une durée de vie maximale de 100 ans possède des fibroblastes qui, s'ils proviennent d'un embryon, ont un PDL de 40 à 60. Les tortues des Galapagos dont la durée de vie est deux fois supérieure à celle de l'homme (175 ans) ont des cellules qui se divisent également plus longtemps en culture (Goldstein, 1974).

Par contre, les fibroblastes provenant d'animaux dont la durée de vie est plus limitée tels que la souris (3,5 ans), le hamster (4 ans) et le poulet (30 ans) ont des PDL plus restreints en

culture (respectivement 14 à 28, 20 à 30, 15 à 35) Todaro et Green, 1963, Lima et Macieira-Coelho, 1972, Raes et Remacle non publié).

Il semble donc qu'il y ait une relation entre la durée de vie in vivo et la capacité mitotique in vitro.

Le vieillissement s'exprime donc in vivo et in vitro par un déclin continu de la croissance et de la viabilité.

Notons cependant que Stanley et al. (1975) trouvent qu'il n'y a pas de corrélation étroite entre l'âge maximal des espèces et le PDL de leurs cellules en culture.

V. TRANSPLANTATIONS SÉRIÉES DE TISSUS IN VIVO

Une des limites des expériences réalisées sur les cultures de cellules est que ces dernières ne se trouvent pas dans des conditions physiologiques et donc que le vieillissement observé pourrait être un artéfact dû aux conditions de la culture. Des expériences de transplantations sériées ont été réalisées afin de vérifier si l'on obtenait une limite au potentiel de division des cellules lorsque celles-ci étaient maintenues dans l'environnement approprié que constitue le milieu corporel.

Plusieurs problèmes se posent dans ces expériences de transplantation : le tissu transplanté doit se distinguer du tissu hôte mais en même temps se trouver dans un environnement qui lui permette une croissance et un fonctionnement normaux. Il est également nécessaire d'éviter le rejet immunitaire. Afin d'éluder ces trois problèmes, Daniel et al. (1968) ont transplanté successivement des glandes mammaires de souris à de jeunes hôtes isogéniques qui en avaient subi une ablation préalable.

Ces expériences ont été réalisées sur trois souches de souris différentes. Dans tous les cas considérés, la croissance diminuait avec l'âge des tissus, et cessait après 4 à 7 transplantations réalisées sur une période maximale de 24 mois. Ces chercheurs (1971) ont montré qu'une influence hormonale pouvait stimuler la croissance du "transplant". Cependant si cette action permet, de fait, quelques transplantations supplémentaires, elle n'empêche pas l'arrêt de la croissance.

Un autre type de transplantations sériées a été réalisé par Harrisson (1975).

Celui-ci a injecté des cellules de base de la moelle osseuse à des souris préalablement irradiées ou atteintes d'anémie d'origine génétique. Ces cellules sont capables de recoloniser la rate et la moelle, de reformer des cellules sanguines et de guérir les animaux anémiques. Les cellules transplantées peuvent être distinguées des cellules de l'hôte sur base de leurs caractéristiques chromosomiques.

Les cellules de la moelle osseuse ont pu ainsi être transplantées d'un hôte à l'autre durant une période plus longue que la vie de l'animal dont elles provenaient. Cependant, leur capacité de guérir les animaux irradiés ou anémiques diminue au cours des transplantations successives.

Ces expériences montrent donc que des tissus, stimulés à la division par des transplantations successives, ont un potentiel de division accru mais cependant limité. L'environnement optimal dans lequel ils se trouvent ne leur permet pas de survivre indéfiniment (Daniel, 1975). On ne peut cependant pas nier l'influence de facteurs extérieurs (de type hormonaux par exemple) sur le développement et la capacité de division des tissus (Daniel et al., 1971).

Il faut noter que la diminution de la croissance pourrait aussi résulter du traumatisme subi par le tissu au cours des transplantations.

Daniel et al. (1968) ont réfuté cette hypothèse en montrant que des cellules malignes ou prémaligènes de tissus mammaires transplantées dans les mêmes conditions que les cellules normales, croissent indéfiniment.

Une similarité de comportement existe donc entre les cellules normales transplantées in vivo et les cellules normales cultivées in vitro puisque ces deux types de cellules ont un potentiel de division limité quelles que soient les conditions de leur environnement. Les cellules cancéreuses transplantées in vivo et les cellules transformées cultivées in vitro sont quant à elles caractérisées par une croissance illimitée.

Soulignons encore que dans les expériences de Harrisson (1975) la diminution de la croissance des tissus survient après une période plus longue que la durée de vie de l'espèce. Il semble donc que la perte du potentiel de division ne soit pas la cause primordiale du vieillissement de l'animal. Elle représenterait plutôt comme nous l'avons dit plus haut, une conséquence d'autres altérations ou modifications qui apparaissent préalablement.

VI. MODIFICATIONS LIEES AU VIEILLISSEMENT

La plupart des modifications survenant au cours du vieillissement des cellules diploïdes en culture ont été reprises par Hayflick (1980), Nous n'en développerons que quelques-unes.

a) Modifications morphologiques et cytologiques

L'augmentation progressive de la taille des cellules au cours de leur vieillissement in vitro a été fréquemment décrite (Hayflick et Moorhead, 1961, Bowman et Daniel, 1975a, Mitsui et Schneider, 1976). Les cellules qui, dans les jeunes cultures, sont fusiformes et présentent une bipolarité, s'étalent et s'aplatissent en phase III. L'accroissement de leur volume et de leur surface s'accompagne d'une diminution de la densité cellulaire à confluence (Schneider et Mitsui, 1976, Wolosewicz et Porter, 1976). En fait, les cultures de cellules présentent dès le départ une certaine hétérogénéité. Le type de "cellules vieilles" apparaît déjà au niveau des jeunes cultures et leur nombre augmente avec le vieillissement (Bowman et al., 1975, Van Gansen et al., 1979, Wolosewicz et Porter, 1976). Les techniques d'autoradiographie ont montré que ce sont ces cellules qui perdent leur capacité de se diviser (Bowman et al., 1975). L'augmentation de la taille des cellules n'est pas liée à un accroissement de la quantité de DNA selon Schneider et Fowlkes (1976). Cependant, certains auteurs ont rapporté des cas de polyploïdies, d'aneuploïdies et d'aberrations chromosomiques à la fin de la vie des cultures (Chen et Ruddle, 1974, Thompson et Holliday, 1975).

Le réticulum endoplasmique rugueux remarquablement dilaté en larges citernes chez les cellules jeunes, régresse chez les vieilles cellules (Van Gansen et al., 1979, Brandes et al., 1972, Lipetz et Cristofalo, 1972).

Un accroissement et une désorganisation du cytosquelette ont été observés chez les fibroblastes humains et murins sénescents (Lipetz et Cristofalo, 1972, Van Gansen et al., 1979).

L'augmentation du nombre et de la taille des lysosomes représente une des modifications les plus marquantes du vieillissement cellulaire (Lipetz et Cristofalo, 1972, Brandes et al., 1972, Van Gansen et al., 1979). Une accumulation des corps résiduels et des vacuoles autophagiques a également été mise en évidence.

Deamer et Gonzales (1974) ont montré chez les cellules sénescents, la présence d'un grand nombre de particules fluorescentes. Il s'agirait de lysosomes, d'après leur taille, leur nombre et la présence de phosphatase acide. La fluorescence serait due à des composés flaviniques et aminoiminopropènes appelés lipofuscine (voir théorie des radicaux libres), qui s'accumuleraient dans ces organites au cours du vieillissement.

b) Modifications physiologiques et biochimiques

Le vieillissement ne semble pas accompagné de changements dans la capacité respiratoire ou glycolytique des cellules WI-38. Les enzymes de la glycolyse ne montrent en général pas de modifications significatives de leur activité. Malgré la faible activité mitotique observée chez les cellules vieilles, celles-ci garderaient donc la capacité de produire de l'énergie (Cristofalo, 1970).

La chaîne des pentoses-phosphate est d'une importance capitale pour la cellule : elle intervient d'une part dans

la formation du ribose et d'autre part dans la réduction du NADP^+ en NADPH.

L'activité de la G6PD, premier enzyme de la chaîne, semble augmenter chez les cellules vieilles (Cristofalo, 1970). Par contre, la 6-phosphogluconate déshydrogénase, la transaldolase, la transcétolase montrent une réduction significative de leur activité (Cristofalo, 1970). Ces changements seraient à l'origine d'une réduction de la synthèse de ribose-5-phosphate à partir du glucose et seraient donc liés à la diminution de son incorporation dans les nucléotides et les acides nucléiques (Cristofalo, 1970).

Dans les cultures de cellules, la perte du potentiel de division constitue le stade ultime de la phase III. Plusieurs facteurs contribuent à ce déclin. Il y a tout d'abord une augmentation de la proportion de cellules incapables de se diviser (Schneider et Fowlkes, 1976, Absher et al., 1974). Les expériences de clonage de cellules ont montré que même dans les jeunes cultures, un certain nombre de cellules montrent un faible potentiel de division. Leur proportion augmente avec le vieillissement (Hayflick et al., 1973, Smith et Hayflick, 1974, Smith et Whitney, 1980). Le déclin de la croissance pourrait être également dû à une augmentation du temps de division des cellules capables de se multiplier plutôt qu'à une accumulation de cellules qui ne se divisent plus (Macieira - Coelho et al., 1976, Grove et Cristofalo, 1977).

Le vieillissement des cellules s'accompagne notamment d'une augmentation de leur contenu total en protéines (Wang et al., 1970, Kaji et al., 1980), en lipides (Kritchevsky et Howard, 1970) et en RNA (Cristofalo et Kritchevsky, 1969).

L'activité de plusieurs enzymes diminue chez les cellules sénescences; elle ne change pas pour certains tandis qu'elle augmente pour d'autres (pour une revue voir Hayflick, 1980). C'est le cas notamment pour de nombreux enzymes lysosomiaux. Cette augmentation va de pair avec un accroissement du nombre de ces organites. Nous verrons plus tard que les modifications des enzymes touchent non seulement leur activité mais également leur structure.

VII. AGENTS CAPABLES D'AUGMENTER LA VIE DES CELLULES IN VITRO

En fait, très peu de substances se sont montrées capables de prolonger la vie des fibroblastes in vitro. Les effets favorables de l'albumine et de la vitamine E mis en évidence respectivement par Todaro et Green (1964) et Packer et Smith (1974) n'ont jamais été confirmés dans d'autres laboratoires. En ce qui concerne les résultats obtenus sur la vitamine E, les chercheurs se sont eux-mêmes formellement rétractés (Packer et Smith, 1977).

Par contre, plusieurs auteurs ont montré que la cortisone et l'hydrocortisone sont capables d'augmenter de 30 à 40 % le potentiel de division des cellules humaines diploïdes en culture (Macieira-Coelho, 1966, Cristofalo, 1970). Plus tôt ces substances sont ajoutées aux cultures et plus efficace est leur action. Lorsque l'hydrocortisone est soustraite aux cultures qui ont vécu au-delà de leur durée de vie normale, celles-ci meurent endéans deux générations.

Le mécanisme d'action de ces substances est encore inconnu; certains résultats récents suggèrent que l'hydrocortisone aurait un effet stimulant sur la synthèse du RNA.

(Ryan et Cristofalo, 1979, Macieira-Coelho et Loria, 1973 et 1974).

VIII. THEORIE DU VIEILLISSEMENT

De nombreuses théories ont été avancées pour expliquer le vieillissement des cellules. Toutes ces théories se rattachent à deux grandes familles : l'une fait intervenir un programme ou une horloge qui tient compte du nombre de divisions, du temps écoulé et de certains processus qui se déroulent dans la cellule pour expliquer l'apparition du vieillissement à un moment déterminé.

L'autre tendance explique la sénescence par l'apparition et l'accumulation d'erreurs à divers niveaux de fonctionnement de la cellule.

Nous ne développerons pour chacune de ces tendances que quelques théories.

a) Théories du vieillissement programmé

Elles suggèrent que le vieillissement représente une valeur adaptative positive pour l'espèce. Des mécanismes bien définis auraient donc évolué pour garantir la sénescence à un moment approprié. Ces idées ont conduit à la notion d'un programme du vieillissement. On constate que les mécanismes proposés pour expliquer cette théorie, évoluent parallèlement avec nos connaissances en génétique moléculaire.

1. La théorie du "codon restriction"

Cette hypothèse émise par Strehler (1967) considère la sénescence comme une conséquence de la différenciation et du développement. Les cellules différenciées perdraient la capacité de traduire l'information génétique. Une manière d'expliquer cette perte de capacité serait la suivante : deux des molécules importantes de la traduction du message génétique sont les RNA de transfert (tRNA) et les aminoacyl-tRNA synthétases. Puisque vingt acides aminés sont codés par 61

codons, un acide aminé pourra être codé par plusieurs triplets différents. Le code génétique est donc dégénéré et les molécules décodantes le seraient également : il peut y avoir pour un acide aminé donné plusieurs tRNA et aminoacyl-tRNA synthétases.

L'absence dans une cellule d'un tRNA ou d'une aminoacyl-tRNA synthétase décodant un triplet particulier la rendrait incapable de synthétiser une protéine contenant un acide aminé codé par ce triplet. Par contre, une protéine dont le même acide aminé est codé par un autre triplet pourra être synthétisée.

Le set de tRNA et d'aminoacyl-tRNA synthétases présent dans la cellule déterminerait donc les messages qui peuvent être traduits.

Il existe de nombreuses données montrant un changement séquentiel dans les profils des tRNA et des aminoacyl-tRNA synthétases durant la différenciation et le développement (voir Kanungo, 1980). On peut donc imaginer un changement séquentiel des codons traduits et donc des protéines synthétisées.

Les aminoacyl-tRNA synthétases figurent parmi celles-ci et leurs synthèses successives perpétueraient l'utilisation spécifique de certains tRNA à un moment donné.

D'autres facteurs tels la répression des gènes codant pour les tRNA et les aminoacyl-tRNA synthétases, et des modifications posttraductionnelles des tRNA interviendraient également dans ce processus.

Pour Strehler (1967), la différenciation serait programmée; elle conduirait à la sénescence parce que la cellule perdrait la capacité de traduire certains messages qu'elle pouvait traduire au début de son développement. Elle serait donc incapable de remplacer certaines protéines qui se sont détériorées bien qu'elle possède encore toute l'information génétique.

Ce mécanisme qui mène à la différenciation conduirait finalement la cellule à sa mort.

Cette théorie n'explique cependant pas quels sont les facteurs qui altèrent l'expression des gènes ou qui sont à l'origine des modifications posttraductionnelles des tRNA..

2. Théorie de la régulation des gènes

Cette théorie est proposée par Kamungo(1980). Celui-ci présente plusieurs données montrant que le développement et la différenciation font intervenir une séquence d'expression et de répression de certains gènes uniques, modulés par des facteurs endogènes.

Pour lui, l'apparition du vieillissement serait basée sur le même principe. Certaines substances endogènes produites elles-mêmes par la modulation des gènes, déstabiliseraient l'expression génétique. Ces changements entraîneraient des modifications dans la proportion des produits (enzymes) et des sous-produits (hormones, métabolites) de la transcription. Certains facteurs extérieurs tels que la température, la nutrition, le stress auraient également une influence sur l'expression génétique.

D'un point de vue moléculaire, la modulation des gènes se ferait par l'intermédiaire d'histones et de protéines non histoniques.

Les histones qui sont des molécules non spécifiques ont un effet de répression sur la fonction des gènes. Les protéines non histoniques, hétérogènes sont impliquées dans une régulation plus fine. Des modifications covalentes (phosphorylation, acétylation, méthylation, ADP ribosylation) affectant l'association de ces protéines avec le DNA, seraient provoquées par des effecteurs endogènes (l'oestradiol et le calcium par exemple).

Si le fonctionnement des gènes change avec le vieillissement, on peut s'attendre à des modifications au niveau de la traduc-

tion, du turnover et finalement de la proportion des enzymes présents dans la cellule. En conséquence, de nombreuses fonctions s'en trouveraient altérées.

Les théories du vieillissement programmé ont l'avantage de pouvoir expliquer d'une façon très simple la transformation des cellules et certaines maladies génétiques comme la progérie et le syndrome de Werner.

Toute mutation qui interfère avec le programme de vieillissement aurait pour effet soit de rendre les cellules immortelles (dans des cellules transformées) soit de raccourcir fortement la durée de vie (cas de la progérie et du syndrome de Werner).

Soulignons que, jusqu'à présent, le manque de preuves expérimentales constitue la grande faiblesse de ces hypothèses.

b) Théorie de l'erreur

1. Théorie des mutations somatiques

La théorie des mutations somatiques suggère que des dommages génétiques survenant au hasard s'accumuleraient au cours de la vie des cellules.

L'accumulation de ces modifications provoquerait la sénescence et finalement la mort des cellules.

Saksela et Moorhead (1963) et Thompson et Holliday (1975) ont en effet mis en évidence une augmentation de l'aneuploïdie et des aberrations chromosomiques chez les cellules en culture. La mutagenèse engendrée par des réactions ionisantes accélère le vieillissement des fibroblastes de poulet mais non ceux de l'homme (Macieira-Coelho, 1976).

Les preuves d'une augmentation des mutations au cours du vieillissement sont le plus souvent indirectes.

Fulder (1979) a cependant pu montrer que le nombre de variants génétiques de fibroblastes MCR5 augmente avec le vieillissement des cellules. Ces variants se caractérisent par un phénotype particulier révélé par une nouvelle méthode histochimique et résultant de la présence de G6PD modifiée ou présente en plus grande quantité.

Par contre leur fréquence, bien que non nulle, reste constante au cours des divisions des cellules transformées. Tenant compte de leur caractère héréditaire, de leur fréquence d'apparition et de leur sensibilité à la mutagenèse, Fulder (1979) considère ces variants comme résultant probablement de mutations au niveau du matériel génétique.

Cependant aucune preuve n'indique que ces mutations sont la cause du vieillissement ou au contraire un effet des modifications survenant au niveau d'autres processus cellulaires (telle que la synthèse des protéines).

Des modifications de la DNA polymérase (Linn et al., 1976) pourraient en effet introduire de telles mutations.

Thompson et Holliday (1978) ont traité des fibroblastes MRC5 avec de la colchicine durant 3 à 6 heures. Ils ont pu obtenir des populations contenant 60 % de cellules tétraploïdes qui continuèrent à se diviser. Leur durée de vie n'était pas différente de celle des cellules diploïdes. Ces résultats sont en contradiction avec la théorie des mutations. En effet, les cellules tétraploïdes mieux protégées contre les mutations et les défauts génétiques devraient selon la théorie avoir une vie plus longue que les cellules diploïdes.

Nous venons de développer une théorie expliquant le vieillissement par l'apparition de dommages au niveau du DNA.

Il existe cependant dans la cellule, un système capable de réparer les altérations survenues au DNA.

Une théorie tente d'expliquer le vieillissement par une déficience du système de réparation. Un argument en ce sens est la présence d'un grand nombre de cassures de la chaîne de DNA chez les cellules vieilles (Price et al., 1971).

Les fibroblastes provenant d'individus atteints de progérie, montrent en même temps qu'un faible potentiel de division, une diminution de leur capacité de réparer les dommages du DNA causés par des rayons X (Epstein et al., 1973). A l'encontre de cette théorie, on note que les patients atteints de xeroderma pigmentosum, qui présentent également une déficience dans la réparation du DNA ne montrent pas de signe de vieillissement prématuré, et la durée de vie de leurs fibroblastes en culture est normale. De plus, dans les cultures de fibroblastes normaux, la capacité de réparer le DNA ne diminue pas sauf à l'extrême limite de la vie des cellules. Cette altération pourrait alors s'expliquer par la présence d'autres modifications survenues préalablement et elle ne serait donc pas une cause du vieillissement mais plutôt une conséquence.

2. Théorie des radicaux libres

Les radicaux libres sont des composés hautement réactionnels dérivés d'atomes ou de molécules qui contiennent un électron non apparié sur la dernière orbitale. Ces radicaux seraient à l'origine d'importants dommages affectant notamment les membranes et les macromolécules biologiques indispensables telles que les protéines, les acides nucléiques, les lipides. Capables de s'autopropager, ils contribueraient au déclin de l'intégrité de la cellule et au

vieillissement (Sheldrake, 1974, Gordon, 1974, Leibovitz et Siegel, 1980, Halliwell, 1978).

Dans les systèmes biologiques, l'apparition de radicaux libres se fait le plus communément par la production de radicaux superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) à partir d'oxygène. Les phosphorylations oxydatives, de même que plusieurs enzymes (xanthine oxydase, aldéhyde oxydase, galactose oxydase (Leibovitz et Siegel, 1980) interviennent dans la formation d' $O_2^{\cdot -}$. Normalement, ces molécules sont détruites et transformées en H_2O_2 , H_2O et O_2 par trois enzymes : la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase. Cependant, elles peuvent donner naissance à des radicaux plus actifs encore : les radicaux hydroxyls (OH^{\cdot}). Les acides gras insaturés représentent des cibles de choix pour les radicaux hydroxyls et superoxydes. Ils se transforment alors en radicaux lipides (L^{\cdot}) et en radicaux peroxydes (LOO^{\cdot}) qui se décomposent par des réactions en chaîne. La malonaldéhyde qui en résulte peut former des bases de Schiff avec les groupements aminés des protéines, des phospholipides et des acides nucléiques. Le produit de cette réaction est une molécule de taille beaucoup plus élevée que l'originale qui, à cause des liaisons intramoléculaires inhabituelles, ne sera pas digérée par les lysosomes. Ces molécules aminoiminopropènes (la lipofuscine) composés indigestes résultant des réactions de peroxydation, s'accumuleraient dans les lysosomes. Elles sont dotées d'une fluorescence particulière qui leur a donné le nom de "pigment du vieillissement". L'accumulation de lipofuscine pourrait provoquer une maladie de surcharge lysosomiale. Les conséquences de l'action des radicaux libres sont innombrables. Les membranes intracellulaires, riches en acides gras insaturés y sont particulièrement sensibles. Une altération

des membranes des lysosomes pourrait permettre la libération de leur contenu et provoquer des dommages au cytoplasme, au noyau, ...

La formation de base de Schiff à partir des protéines et des acides nucléiques modifierait le fonctionnement de ces molécules.

Les radicaux libres seraient également capables d'inhiber certains enzymes en transformant les groupements sulfhydryls en liens disulfures.

Certaines modifications prédites par la théorie des radicaux libres ont été observées chez de vieux organismes (Munnell et Getty, 1968, Strehler et al., 1959).

Nous avons cité précédemment l'accumulation de lipofuscine chez les cellules WI-38 (Deamer et Gonzales, 1974).

Certaines substances ayant des propriétés antioxydantes, sont capables de diminuer l'action des radicaux libres : il s'agit par exemple de la vitamine E, de l'acide ascorbique etc... Ces molécules se sont montrées capables de protéger certains champignons contre les radicaux libres et d'augmenter leur durée de vie (Munkress et Minssen, 1976, Epstein et Gershon, 1972, Munkress, 1976). Rappelons que les résultats positifs obtenus par Packer et Smith, (1974) sur les fibroblastes en culture n'ont pu être reproduits.

3. Théorie de l'erreur catastrophique

La théorie de l'erreur catastrophique est la théorie qui a été la plus controversée et il est impossible ici de donner tous les arguments pour ou contre cette théorie et les nuances que de nombreux auteurs y ont introduites.

Nous nous limiterons ici à exposer les principes généraux de cette théorie telle qu'elle a été proposée par Orgel en 1963 puis développée en 1973 et les principaux arguments expérimentaux qui lui sont favorables. Une analyse plus critique impliquant les résultats de cette thèse sera donnée dans

notre discussion.

En 1963, Orgel suggérait que l'apparition d'erreurs au niveau des mécanismes de la synthèse protéique serait le ou un des facteurs qui amèneraient la dégénérescence des cellules.

La synthèse protéique comporte plusieurs étapes que l'on peut résumer succinctement de la manière suivante : l'étape de transcription qui comprend la formation du RNA messager (mRNA) à partir d'un fragment de DNA, et l'étape de traduction durant laquelle le mRNA est traduit en protéines au niveau du ribosome par l'intermédiaire de RNA de transfert (tRNA). Celui-ci se lie à un acide aminé à l'aide d'une aminoacyl-tRNA synthétase.

Une certaine fréquence d'erreurs faible, mais cependant non nulle est associée à chacune de ces étapes. Des erreurs dans la synthèse des RNA de transfert et ribosomiaux peuvent également altérer la fidélité du mécanisme de synthèse. Si les molécules modifiées interviennent dans la structure ou le métabolisme de la cellule, les conséquences ne seront normalement pas dramatiques puisque ces enzymes seront dilués par d'autres enzymes normaux puis finalement catabolisés.

Par contre, ces modifications auront un rôle effectif dans le vieillissement si elles touchent des enzymes qui interviennent eux-mêmes dans la synthèse des protéines. Ce seront par exemple les RNA polymérases, les aminoacyl-tRNA synthétases, les protéines ribosomiales etc... Dans ce cas, les erreurs se propageront par rétroaction positive à tel point que, si ce processus se répète plusieurs fois, la cellule sera incapable de fonctionner normalement.

Cette hypothèse permet d'émettre au moins deux prédictions :

a) des protéines anormales vont apparaître au hasard au cours

de la sénescence; b) toute augmentation de la fréquence des erreurs au niveau de la synthèse des protéines doit accélérer le vieillissement.

Tester directement la première conséquence de cette théorie, c'est-à-dire mettre en évidence dans une population d'enzymes la présence de molécules dont la séquence en acides aminés est modifiée, est techniquement difficile à réaliser.

Cependant, on sait que des modifications de séquences changent très souvent les propriétés des enzymes et notamment leur thermostabilité (Langridge, 1968). Se basant sur ces données, Holliday et Tarrant (1972) ont étudié la thermolabilité de deux enzymes cytoplasmiques : la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase provenant de fibroblastes humains en culture. Leurs résultats mettent en évidence l'apparition progressive au cours du vieillissement d'une fraction thermolabile de ces enzymes; celle-ci atteint 20 % de l'activité enzymatique totale chez les cellules âgées. Ces chercheurs ont également montré que l'enzyme thermolabile présente une spécificité modifiée pour le substrat. En effet, il réagit avec un analogue du substrat plus efficacement qu'un enzyme normal.

La présence de CRM (cross reacting material) peut révéler également la présence d'enzymes altérés. Il s'agit de mettre en évidence des protéines dépourvues d'activité catalytique mais qui ont gardé des sites antigéniques identiques à ceux de l'enzyme normal.

Par cette méthode, l'accumulation de molécules inactives au cours du vieillissement a été mise en évidence pour plusieurs enzymes telles la lactate déshydrogénase dans les fibroblastes humains, l'isocitrate lyase chez le nématode Turbatrix aceti. Un résumé de ces modifications est donné dans la table IV.

Les fibroblastes provenant d'individus atteints du syndrome de Werner ou de progérie ont, nous l'avons vu, un potentiel de division réduit en culture. Ils se caractérisent également par la présence de fractions enzymatiques thermolabiles dans les premières générations de la culture. Ce phénomène fut mis en évidence pour la G6PD, la 6-phosphogluconate déshydrogénase, l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transférase (Goldstein et Moerman, 1975a, 1975b, Goldstein et Singal, 1974, Holliday et al., 1974).

La deuxième conséquence de la théorie d'Orgel est que toute augmentation dans le nombre d'erreurs au niveau des protéines devrait accélérer le vieillissement et raccourcir la durée de vie. Cette hypothèse a été testée en ajoutant au milieu nutritif de divers organismes, des analogues de bases du RNA ou des analogues d'acides aminés. Ces molécules sont suffisamment semblables aux acides aminés ou aux bases du RNA, pour être incorporées dans les protéines ou les molécules de RNA, mais elles sont en même temps assez différentes pour modifier la fonction des molécules qui les contiennent. Elles devraient donc, si l'hypothèse d'Orgel est exacte, initier une erreur catastrophique qui engendrerait un vieillissement prématuré. Holliday et Tarrant ont traité des fibroblastes humains en culture avec un analogue d'une base du RNA (le 5-fluorouracil). Ils trouvèrent que cette substance, non seulement, raccourcit la vie des cellules mais provoque également une accumulation de G6PD thermolabile. Ces résultats ainsi que ceux obtenus par Lewis et Holliday (1970) corroborent bien la théorie d'Orgel. Ces derniers ont étudié un mutant de Neurospora crassa (leu-5). Cette souche dont la durée de vie est normalement illimitée à 20-25°C, meurt après 3 à 4 jours lorsqu'elle est

placée à une température de 37°C.

Ce mutant possède une leucyl-tRNA synthétase anormale qui ne reconnaît pas la leucine mais peut se lier à n'importe quel autre acide aminé.

La présence de cet enzyme modifié pourrait selon la théorie d'Orgel, favoriser l'apparition de protéines altérées et provoquer le vieillissement. Lewis et Holliday (1970) ont en effet montré que ce mutant après son transfert à 37°C, voit augmenter de façon dramatique la proportion de glutamate déshydrogénase altérée.

Ces expériences apportent donc des arguments à l'hypothèse de l'erreur catastrophique mais leur limite est le caractère éloigné du système d'étude avec le vieillissement tel qu'on l'entend habituellement.

Théorie généralisée de l'erreur catastrophique

Lorsque nous avons présenté la théorie de mutations, nous avons souligné qu'il était difficile de savoir si à l'origine, le vieillissement était dû à une augmentation des mutations ou si celles-ci étaient une conséquence d'erreurs dans la synthèse de protéines (modification de la DNA polymérase par exemple).

D'autre part, les radicaux libres peuvent être à l'origine de déficiences tant au niveau du DNA (ils pourraient provoquer également des mutations), qu'au niveau des protéines (entraînant des erreurs de synthèse) et des membranes (la libération du contenu lysosomal engendrerait d'autres dommages consécutifs). Nous constatons que tous ces processus sont fortement imbriqués les uns dans les autres. Il est dès lors très difficile d'établir si les altérations du mécanisme de synthèse sont la cause ou le résultat de modifications survenant au niveau d'autres processus.

Tenant compte de ces considérations, Orgel (1973) a étendu son idée à une théorie généralisée du vieillissement. Cette théorie retient l'idée d'une rétroaction positive quelle que soit son origine : plus élevée sera le nombre d'erreurs apparues dans les constituants macromoléculaires, et plus rapide sera l'accumulation de nouvelles erreurs.

Cette explication du vieillissement place sur le même plan de causalité, les mutations, les déficiences des mécanismes de contrôle, les altérations de membranes, l'action des radicaux libres et les erreurs au niveau de la synthèse protéique, sans donner de priorité à aucun de ces processus.

Orgel, dans sa théorie de l'erreur catastrophique, tente d'expliquer le vieillissement mais par contre, il ne donne aucune information sur un processus possible de transformation des cellules.

Holliday et al. (1977) ont suggéré une hypothèse expliquant comment l'immortalité des cellules peut être assurée en dépit du caractère inévitable de l'accumulation des erreurs. Ils considèrent qu'au départ, toutes les cellules sont immortelles ou "non engagées". Au fur et à mesure des divisions cellulaires, apparaissent des cellules "engagées" dans lesquelles une erreur critique s'est produite, celle-ci les conduit inévitablement vers la mort au moyen d'un système d'amplification de l'erreur par rétroaction positive, tel qu'il a été décrit plus haut.

Ils ont fait divers calculs sur le comportement des cellules en culture. Ils montrent que la probabilité de vie d'une culture est affectée par divers facteurs tels que la taille de la culture, la probabilité qu'une erreur critique "engage" un clone et le conduise à la mort et enfin, le nombre de divisions entre l'initiation de l'événement critique et la mort ultime du clone.

Une des conclusions les plus paradoxales qui résulte de ces calculs, est que les cultures de cellules transformées peuvent être immortelles parce que les erreurs s'y accumulent plus rapidement que dans les cellules diploïdes normales.

En effet, vu que ces dernières accumulent lentement les erreurs, le nombre de cellules "engagées" pourra augmenter et elles entreront donc en compétition avec les cellules "non engagées". La proportion de cellules "engagées" va croître continuellement dans la culture puisque continuellement de nouvelles cellules normales vont devenir "engagées". Dans les cellules transformées, l'accumulation d'erreurs est très rapide et les cellules "engagées" meurent rapidement; elles ne savent donc pas entrer en compétition avec les cellules "non engagées" et ces dernières se maintiennent dans la culture.

Par contre, dans une culture de cellules normales, si les cellules "engagées" se divisent pendant un grand nombre de générations à une vitesse identique à celle des cellules non "engagées" et si la taille de la culture est limitée, on obtiendra des cultures de cellules ne contenant plus que des cellules "engagées" c'est-à-dire destinées à mourir.

IX. VERIFICATION DE LA THEORIE DE L'ERREUR CATASTROPHIQUE

a) Etude d'enzymes appartenant à divers compartiments subcellulaires

La présence d'une fraction enzymatique thermolabile de la G6PD et de la 6-phosphogluconate déshydrogénase chez les fibroblastes humains sénescents (Holliday et Tarrant, 1972) est considérée comme un argument en faveur de la théorie de l'erreur catastrophique émise par Orgel (1963).

Ces deux enzymes appartiennent au compartiment cytoplasmique de la cellule. L'hypothèse d'Orgel suggère que les erreurs touchant au mécanisme de synthèse protéique, modifieraient les molécules au hasard. Ces altérations devraient donc atteindre également les enzymes des différents compartiments subcellulaires. Nous avons voulu tester cette hypothèse en étudiant l'évolution de la thermolabilité au cours du vieillissement, d'enzymes appartenant aux lysosomes, aux mitochondries et aux peroxysomes en les comparant avec la G6PD située dans le cytoplasme.

Nous avons travaillé sur deux types de cellules qui montrent chacun un intérêt particulier : les fibroblastes WI-38 dont le vieillissement a été étudié sous différents aspects dans de nombreux laboratoires et les fibroblastes WS-HMG qui proviennent d'individus atteints du syndrome de Werner.

b) Choix des enzymes étudiées

Le choix des enzymes étudiées s'est fait selon plusieurs critères : il fallait d'abord qu'ils soient localisés dans un organe subcellulaire particulier; ensuite la sensibilité de leur dosage devait être très grande. En effet, la faible quantité de matériel que représente les cellules en culture (voir Matériels et Méthodes) constitue un facteur limitant pour nos expériences. Nous avons donc choisi des enzymes dont le dosage par les méthodes disponibles était très sensible. Dans la mesure du possible, nous avons également recherché des enzymes qui ne possèdent pas d'isoenzymes et dont la population de molécules est normalement homogène.

Ce troisième critère de choix est important au niveau de l'interprétation des courbes de thermolabilité. Une homogénéité des enzymes, au départ, nous permettra de mettre en évidence plus facilement et de façon plus significative toute variation éventuelle de leur thermolabilité chez les cellules vieilles.

C'est sur cette base que nous avons sélectionné la N-acétyl- β -D-glucosaminidase (NA β Glu), la N-acétyl- α -D-galactosaminidase (NA α Gal), l' α -D-glucosidase (α -Glu) pour les lysosomes, la sulfite cytochrome c réductase pour les mitochondries et la catalase pour les peroxysomes.

X. MECANISME DE L'ALTERATION DE LA G6PD

Bien que les résultats d'Holliday et Tarrant (1972) aient été considérés comme une preuve de la théorie d'Orgel (1963), de nombreuses critiques ont mis en doute l'origine synthétique de l'altération de la G6PD. Orgel lui-même (1973) a émis diverses réserves à ce sujet. Il suggère notamment que la G6PD thermolabile présente dans les vieilles cultures, pourrait provenir de cellules mortes dans lesquelles l'enzyme aurait subi une protéolyse ou une dégradation partielle qui l'aurait modifié. Le 5-fluoro-uracil, qui est supposé augmenter le nombre d'erreurs dans la synthèse protéique, pourrait d'un autre côté avoir un effet toxique et augmenter le nombre de cellules mortes et donc la quantité d'enzyme thermolabile.

Diverses modifications apparaissant au cours du vieillissement, pourraient également favoriser une altération postsynthétique de la G6PD.

Nous avons vu que les radicaux libres peuvent, par des réactions en chaîne, modifier les protéines (oxydation des groupements sulfhydryls, formation de bases de Schiff), altérer les membranes des lysosomes en libérant leur contenu dans la cellule, etc... Des changements dans la vitesse de renouvellement des composés cellulaires dans l'environnement pourraient aussi être à l'origine des modifications des protéines.

Dans la suite de notre travail, nous avons voulu tester si l'altération de la G6PD provenait d'une erreur de synthèse ou si au contraire elle était due à une modification posttraductionnelle de l'enzyme et si tel était le cas, quelle était la cause de cette "altération" enzymatique et les facteurs qui pourraient l'influencer.

Caractérisation de la G6PD

La G6PD peut exister sous différentes formes moléculaires. L'enzyme actif est composé de deux (dimère) ou de quatre sous-unités (tétramère) dont les poids moléculaires sont respectivement de 105.000 et de 210.000 (Cohen et Rosemeyer, 1969, Rattazzi, 1968, Bonsignore et al., 1971a).

Le monomère inactif d'un poids moléculaire de 52.000 environ est constitué d'une simple chaîne polypeptidique codée par un seul gène situé sur le chromosome X (Bonsignore et al., 1971a).

Des groupements SH libres sont nécessaires pour son activité. L'enzyme demande donc un agent réducteur dans son environnement. C'est pourquoi la présence de mercaptoéthanol est requise lors du dosage.

L'EDTA, agent chélatant des ions métalliques, est également nécessaire pour empêcher une inactivation de la G6PD.

Une concentration élevée de NADP^+ (10^{-3}M) est utilisée lors du dosage. Cette molécule qui est le coenzyme de la G6PD, assure aussi la stabilité de l'enzyme en la maintenant sous forme de dimères ou de tétramères (Cancedda et al., 1973).

La G6PD occupe une place primordiale dans la cellule puisqu'il s'agit du premier enzyme catalysant la chaîne des pentoses-phosphate; cette chaîne a deux rôles essentiels dans le métabolisme cellulaire. Elle forme tout d'abord le NADPH indispensable dans l'anabolisme et dans la réduction du glutathion par la glutathion réductase; elle permet ainsi le maintien d'un potentiel d'oxydoréduction adéquat pour la cellule.

Le deuxième grand rôle de la chaîne des pentoses-phosphate est la production de ribose-5-phosphate nécessaire à la synthèse des nucléotides.

La G6PD possède un isoenzyme lié à un chromosome autosomal; il est localisé dans les microsomes et peut donc être facilement éliminé par centrifugation différentielle.

MATERIELS

- Acide Σ -amino - n - caproïque
Sigma Saint - Louis Mo, U.S.A.
- Acrylamide
BDH Chemicals LTD England
- Alun de Chrome
Merck Darmstadt Allemagne Fédérale
- Auréomycine
Lederle S.A. Belgique
- Boîtes de culture en plastique
Falcon Ca, U.S.A.
- Bouteilles de culture en verre
Wheaton U.S.A.
- Carboxyméthyl Séphadex C-50
Pharmacia Uppsala Suède
- Cellules WI-38 et cellules WS-HMG
American Type Culture Collection Maryland U.S.A.
- Cytochrome c
Sigma Saint - Louis Mo, U.S.A.
- Développement photographique
Developer D 19 Kodak
- Diméthylsulfoxyde (DMSO)
Merck Darmstadt Allemagne Fédérale
- Emulsion photographique NTB2 Kodak
- Fixateur photographique rapide
Ilford Hypam 1/9 England
- Gélatine blanche DAB7
Merck Darmstadt Allemagne Fédérale
- Glucose - 6 - phosphate
Sigma Saint - Louis Mo, U.S.A.
- Hémalun
Fluka A.G. Suisse

- H_2O_2
Merck Darmstadt Allemagne Fédérale
- 2-mercaptoéthanol
Sigma Saint-Louis Mo, U.S.A.
- NN'-méthylènebisacrylamide
BDH Chemicals LTD England
- Méthylumbelliferyl-acétamido 2-déoxy β -D-glucopyranoside
Koch Light Laboratories LTD England
- Méthylumbelliferyl α -D-glucopyranoside
Koch Light Laboratories LTD England
- Milieu essentiel minimum de Eagle additionné des sels de Earle
Eurobio Paris France
- MTT
Sigma Saint - Louis Mo, U.S.A.
- Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (sel monosodique)
Sigma Saint - Louis Mo, U.S.A.
- Paranitrophényl - 2 - acétamido - 2 - déoxy - α - D - galactopyranoside
Koch Light Laboratories LTD England
- Peroxydisulfate d'ammonium
Merck Darmstadt Allemagne Fédérale
- Phénazine méthosulfate
Sigma Saint - Louis Mo, U.S.A.
- Riboflavine
Sigma Saint - Louis Mo, U.S.A.
- Sérum de veau foetal
Eurobio Paris France
- Séphadex G-150
Pharmacia Uppsala Suède
- NNN'N'- tétraméthyl éthylène diamine
Merck Darmstadt Allemagne Fédérale
- Thymidine tritiée
NEN England

- Trypsine 1/250

Eurobio Paris France

Les produits d'analyse courants ont été obtenus de la firme
Merck Darmstadt Allemagne Fédérale.

METHODES

I. CULTURE DE CELLULES

a) Caractérisation des cellules utilisées

Nous avons utilisé lors de notre travail deux types de cellules : les fibroblastes WI-38 et les fibroblastes WS-HMG.

Les cellules WI-38 proviennent d'un poumon d'embryon humain femelle; ces cellules furent mises en culture et caractérisées par Hayflick (1965). Elles nous ont été fournies par Hayflick et par l'American Type Culture Collection. Cette organisation nous a également procuré les cellules WS-HMG qui proviennent d'une biopsie de peau réalisée sur un sujet de 49 ans atteint du syndrome de Werner (Martin et al., 1970).

b) Méthode de culture

Le milieu de culture utilisé est constitué du milieu essentiel minimum de Eagle et des sels de Earle. Avant l'emploi, il est ajusté à un pH de 7,4 et additionné de 10 % de sérum de veau foetal, de 50 μ g/ml d'auréomycine et de 2,2 gr/l de NaHCO_3 .

Les cellules sont cultivées dans des boîtes en plastique de 75 cm^2 . Dès leur arrivée à confluence, les cellules sont détachées de leur support par de la trypsine 0,25 % en solution saline tamponnée par du Tris. Elles sont ensuite repiquées à une dilution de 1/4 dans des boîtes identiques. Cependant, avant d'être utilisées pour une expérience, les cellules sont repiquées dans des bouteilles cylindriques (rollers) de 600 cm^2 de surface, placées sur des supports tournant à 0,25 tour par minute (Lab.-Line Instruments Inc. Melrose Park III U.S.A.).

Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère de 5 % de CO₂ et de 95 % d'air.

c) Mesure du vieillissement de la culture

Au cours de 5 années de travail, le nombre maximum de générations des WI-38 a varié entre 51 et 58 générations. Cette valeur dépend principalement des conditions régulières du repiquage et du sérum de veau foetal utilisé. Les cellules WS-HMG ont atteint 9 générations. Ces chiffres variant également d'un laboratoire à l'autre, nous avons préféré exprimer l'âge des cellules en fonction de l'index mitotique de Cristofalo IMC (Cristofalo, 1976).

Cette méthode mesure, par autoradiographie, le nombre de noyaux qui ont incorporé de la thymidine tritiée ($[^3\text{H}]$ dT) en 24 heures.

Elle constitue une mesure quantitative reproductible du vieillissement cellulaire. Elle est réalisée de la manière suivante : les cellules sont repiquées à une densité de $1,3 \times 10^4$ cellules/cm² dans des boîtes en plastique de 25 cm² et incubées 24 heures à 37°C; la $[^3\text{H}]$ dT est alors ajoutée au milieu de culture à une concentration finale de 0,1 μ Curie/ml et les cellules sont de nouveau incubées à 37°C. Après 24 heures, elles sont lavées deux fois avec du milieu sans sérum, fixées 30 minutes dans un mélange alcool absolu - acide acétique (3 volumes pour 1 volume) et séchées une nuit à température ambiante.

Pour permettre une meilleure fixation de l'émulsion photographique, les cellules sont préalablement trempées dans une solution contenant de l'alun de chrome (0,05 %) et de la gélatine (0,5 %), puis séchées durant une journée. La préparation est alors plongée dans la solution d'émulsion (Kodak type NTB2 diluée 4 fois dans de l'eau à 37°C), égouttée 10 à 15 minutes, séchée une nuit en présence de silicagel et placée au minimum 8 jours à 4°C.

Le développement (developper D 19 Kodak) et la fixation (fixateur rapide Ilford Hypam dilution 1/9) se font à 18°C pendant 5 minutes.

L'étape de fixation se termine par un rinçage dans de l'eau distillée, puis dans de l'alcool absolu pendant 2 minutes. Les cellules sont finalement colorées 5 minutes à l'hémalum, rincées à l'eau courante et séchées.

Les résultats de l'autoradiographie sont analysés en comptant le pourcentage de cellules ayant un noyau non marqué dans des champs choisis au hasard. Chaque résultat représente la moyenne du comptage de 500 cellules.

L'index mitotique de Cristofalo représente le pourcentage de cellules qui n'ont pas incorporé la thymidine tritiée en 24 heures.

Il est donc une mesure inverse de la vitesse de croissance de la culture.

Dans notre laboratoire, l'index mitotique pour deux populations de cellules WI-38 ayant atteint 30 et 49 divisions était respectivement de 38 et 68. Une relation linéaire peut être établie entre le logarithme de l'index mitotique et l'âge de la culture (exprimé en pourcentage de l'étendue de vie maximale).

La figure 1 montre que la droite obtenue peut être comparée à celle décrite par Cristofalo et Sharf (1973). Dans notre étude, nous constatons systématiquement un nombre un peu plus important de cellules marquées.

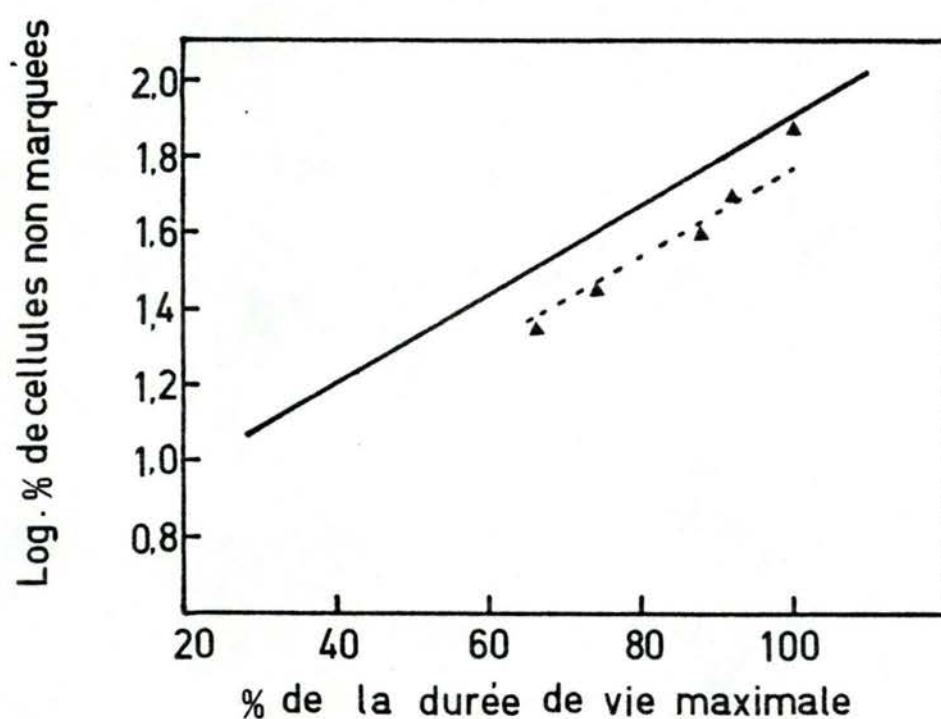


Figure 1.- Logarithme du pourcentage de cellules non marquées en fonction de l'âge de la culture (exprimé en pourcentage de l'étendue de vie maximale). La méthode de marquage est décrite dans le texte.
 (▲) points expérimentaux.
 La droite représente les valeurs obtenues par Cristofalo et Sharf (1973).

d) Congélation - Décongélation des cellules

La congélation des cellules à divers stades de division nous permet de disposer rapidement d'une quantité appréciable de cellules à la génération désirée.

Les fibroblastes en culture sont détachés de leur support par de la trypsine, repris dans du milieu contenant 10 % de sérum et centrifugés 20 minutes à 130 X g dans une centrifugeuse International PRJ (International Equipment Needham Heights Ma, U.S.A.). Le culot de centrifugation est dilué dans 0,4 ml de milieu contenant 40 % de sérum et placé dans une ampoule de verre.

Juste avant la congélation, 0,4 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) est ajouté dans l'ampoule. Celle-ci est immédiatement scellée et placée à 20°C dans l'appareil à congélation (PTLD 75, Air Liquide, Champigny-sur-Marne, France) programmé pour abaisser la température de 1°C par minute jusque - 40°C. Cette température atteinte, l'ampoule est placée dans l'azote liquide (-196°C). Les cellules peuvent alors être conservées indéfiniment sans voir leur nombre de divisions modifié après décongélation.

Contrairement à la congélation, la décongélation est une étape rapide qui doit se dérouler en moins d'une minute : sortie de l'azote liquide, l'ampoule contenant les cellules est directement plongée dans un bain à 40°C et décongelée. Afin d'éliminer le DMSO, l'ampoule est centrifugée à 220 X g pendant 10 minutes (centrifugeuse de table), le milieu de congélation est éliminé, les cellules sont reprises dans du milieu contenant 10 % de sérum et remises en culture.

II. PREPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES

a) Pour l'étude de la glucose-6-phosphate déshydrogénése (G6PD)

Les extraits sont préparés selon la méthode de Holliday et Tarrant (1972).

Les cellules sont rincées deux fois par 10 ml d'un tampon phosphate 10 mM pH 7,4 contenant du NaCl 0,15 M (PBS). Elles sont récoltées à l'aide d'un petit racloir dans un tampon Tris - HCl 25 mM pH 7,4 contenant du NaCl 0,15 M (solution A), puis centrifugées à 220 X g pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot est resuspendu dans un tampon Tris - HCl 50 mM, pH 8 contenant du 2-mercaptoéthanol 1 mM, de l'éthylène diamine tétraacétate (EDTA) 1 mM, de l'acide Σ - amino - n - caproïque 4 mM et du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺) 1 mM (solution B).

Les cellules sont alors traitées de deux manières différentes.

Elles sont : soit soniquées dans un sonicateur (MSE England) à une amplitude de 8 microns durant 30 secondes et centrifugées ensuite à 36.950 x g durant 30 minutes dans un rotor JA 21 à 4°C (centrifugeuse J 21 B Beckman Instruments Inc., Spinco division, Palo Alto, Ca),

soit homogénéisées par 20 à 30 coups de piston serré d'un homogénéiseur Dounce de 7 ml (Kontes Glass Co, Vineland N.J.) et centrifugées à 100.000 x g pendant 30 minutes à 4°C dans un rotor n° 40 (Beckman Instruments Inc., Spinco Division, Palo Alto, Ca).

Le surnageant de centrifugation est utilisé pour le dosage de la G6PD.

Les homogénats et surnageants utilisés dans les expériences décrites ci-dessous sont généralement préparés selon cette deuxième méthode.

- b) Pour l'étude de :
la N-acétyl- β -D-glucosaminidase (NA β Glu)
l' α -D-glucosidase (α Glu)
la N-acétyl- α -D-galactosaminidase (NA α Gal)
la sulfite cytochrome c réductase
et la catalase

Les extraits cellulaires sont préparés selon la méthode de Tulkens et al. (1974) à laquelle nous avons apporté quelques modifications.

Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS, raclées dans du sucrose 0,25 M contenant de l'EDTA 1 mM, centrifugées à 220 x g pendant 10 minutes dans une centrifugeuse de table à t° ambiante. Le culot est resuspendu dans du sucrose 0,25 M et homogénéisé par 20 à 30 coups d'un piston serré dans un homogénéiseur Dounce.

Pour l'étude de la NA α Gal, l' α Glu, la catalase et la sulfite cytochrome c réductase, les solutions de sucrose sont tamponnées respectivement dans de l'acétate 5 mM pH 4, 10 mM pH 4,5, dans de l'imidazole 3 mM pH 8, et 3mM pH 8,5. Pour les trois enzymes lysosomiaux, ces solutions contiennent également 0,1 % d'albumine.

Le dosage de la sulfite cytochrome c réductase nécessite la destruction des mitochondries; celle-ci est réalisée par quatre homogénéisations de 30 secondes à l'ultraturrax (Jankel et Kunkel K.G. Ikawerk, Breisgau, type TP 18-10). Les membranes sont alors éliminées par centrifugation à 100.000 x g pendant 30 minutes à 4°C au rotor n° 40 (Beckman).

III. DOSAGES BIOCHIMIQUES

a) Méthodes de dosages

Les enzymes sont dosés selon des méthodes publiées que nous avons adaptées principalement afin d'augmenter leur sensibilité.

Le résumé des méthodes utilisées et leurs références sont données à la table I.

Ajoutons que la fixation de la réaction lors du dosage des trois enzymes lysosomiaux se fait par addition de 1 ml (pour la NA α Gal) ou de 2 ml (pour l' α Glu et la NA β Glu) d'un tampon glycine-NaOH 50 mM pH 10,5 contenant de l'EDTA 5 mM.

La réaction de la catalase est fixée par 3 ml d'une solution H₂SO₄ 2 N contenant du sulfate de titanyl 14 mM.

La lecture de l'absorbance se fait pour les dosages de la NA α Gal et de la catalase respectivement à 400 et à 420 nm sur un spectrophotomètre (Gilford).

Pour le dosage de l' α Glu et de la NA β Glu, l'apparition de ^{la} fluorescence se lit à 467 nm sur un fluoro-microphotomètre (Aminco, Maryland, U.S.A.), l'excitation se faisant à 360 nm.

La présence d'une activité de la sulfite cytochrome c réductase et de la G6PD se mesure sur un spectrophotomètre (Zeiss PM6, Germany) par une variation d'absorbance respectivement à 550 et à 340 nm.

Les dosages de la NADH cytochrome c réductase, de la 5'-nucléotidase, de la phosphodiesterase alcaline I, de la

Table I - Conditions de dosage des enzymes

E.C. *	Nom	Substrat	Concentration	pH du dosage	Tampon	Autres constituants	Température	Volume	Temps	Produit mesuré	Références
3.2.1.30	N-acétyl- β -D-glucosaminidase	méthylumbelliféryl acétamido 2 déoxy β -D-glucopyranoside	1 mM	3,5	citrate de sodium 0,05 M	Albumine 1 mg/ml Triton x 100 0,2 %	37°C	0,5 ml	60 min.	4-méthylumbelliférone	Van Hoof (1972)
3.2.1.20	α -D-glucosidase	méthylumbelliféryl- α -D-glucopyranoside	1 mM	4,5	acétate de sodium 0,05 M	Triton x 100 0,2 %	37°C	0,5 ml	60 min.	4-méthylumbelliférone	Van Hoof (1972)
	N-acétyl- α -D-galactosaminidase	p-nitrophényl-2- acétamido-2-déoxy- α -D-galactopyranoside	6,25 mM	4	acétate de sodium 0,1 M	Albumine 1 mg/ml Triton x 100 0,2 %	37°C	0,25 ml	60 min.	p-nitrophénol	Van Hoof (1972)
1.8.1.3.	Sulfite cytochrome c réductase	cytochrome c	0,03 mM	8,5	imidazole-HCl 0,1 M	Na ₂ SO ₄ 0,3 mM NaCN 0,4 mM amytal 1,5 mM	25°C	1,0 ml	10 min.	cytochrome c réduit	Wattiaux, De Coninck et Wattiaux (1971)
1.11.1.6.	Catalase	H ₂ O ₂	1,3 mM	8	imidazole-HCl 0,025 M	Albumine 1 mg/ml Triton x 100 0,04 %	25°C	5,2 ml	45 min.	H ₂ O ₂ résiduel	Baudhuin et al. (1964)
1.1.1.49	Glucose-6-phosphate déshydrogénase	glucose-6-phosphate	9,5 mM	8,6	Tris-HCl 0,25 M	NADP ⁺ 0,32 mM MgCl ₂ 19 mM	30°C	0,8 ml	10 min.	NADP ⁺ réduit	Holliday et Tarrant (1972)

* Report of the Commission on enzymes of the International Union of Biochemistry (1964)
Elsevier Publishing Comp. Amsterdam, L., N.Y.

cytochrome oxydase et de la galactosyltransférase ont été décrits pour les cellules WI-38 par Remacle et al. (1980).

La méthode de Lowry et al. (1951) a été utilisée pour le dosage des protéines.

Le NADP^+ est mesuré après sa réduction en NADPH en présence de glucose-6-phosphate 10 mM et de G6PD contenue au départ dans les préparations cellulaires testées (Klingenberg 1974). Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, dans un tampon Tris-HCl 25 mM, pH 7,4 contenant du NaCl 0,15 M, la fluorescence émise par le NADPH est mesurée dans un fluorimètre Aminco-Bowman (longueur d'onde d'excitation de 350 nm, longueur d'onde d'émission de 460 nm) (Kirkman, 1962).

Une solution de NADPH $10 \mu\text{M}$ est utilisée pour l'étalonnage de l'appareil.

Soulignons que du fait de la faible concentration du NADP^+ endogène, le dosage n'a pu être réalisé que sur des préparations cellulaires auxquelles ont été ajoutées préalablement certaines quantités de NADP^+ ; les concentrations mesurables par ce test se situent entre 1 et $50 \mu\text{M}$.

b) Cinétique enzymatique

Une étude préliminaire a été réalisée sur les cinq enzymes étudiées au cours du vieillissement afin de déterminer les conditions optimales de dosage.

1. Effet du pH

La figure 2 montre l'effet du pH sur l'activité enzymatique.

Trois enzymes montrent une activité optimale en milieu acide : la $\text{NA}\beta\text{Glu}$ dont l'activité optimale se situe à pH 3,5 a été localisée dans les lysosomes par Sellinger et al. (1960); l' αGlu , quant à elle, possède un maximum d'activité à pH 4,5, mais l'activité en milieu neutre n'est pas négligeable. Elle traduit, en fait, la présence en faible quantité d'une seconde forme enzymatique qui a son maximum d'activité à pH 6,5 et qui est présente dans les fibroblastes humains. Cependant, l'activité mesurée à pH 4,5 est uniquement due à l'enzyme lysosomal (Lejeune N. et al., 1963). La $\text{NA}\alpha\text{Gal}$ présente un pic d'activité symétrique centré à pH 4; il s'agit également d'un enzyme lysosomal.

La sulfite cytochrome c réductase est un enzyme mitochondrial situé dans l'espace intermembranaire, son pH optimum d'activité est légèrement alcalin (Wattiaux - De Conninck et Wattiaux, 1971).

La catalase est un enzyme typique des peroxysomes; on la trouve cependant en partie dans le cytoplasme. Par fractionnement cellulaire (voir Méthodes, chapitre VI), nous avons

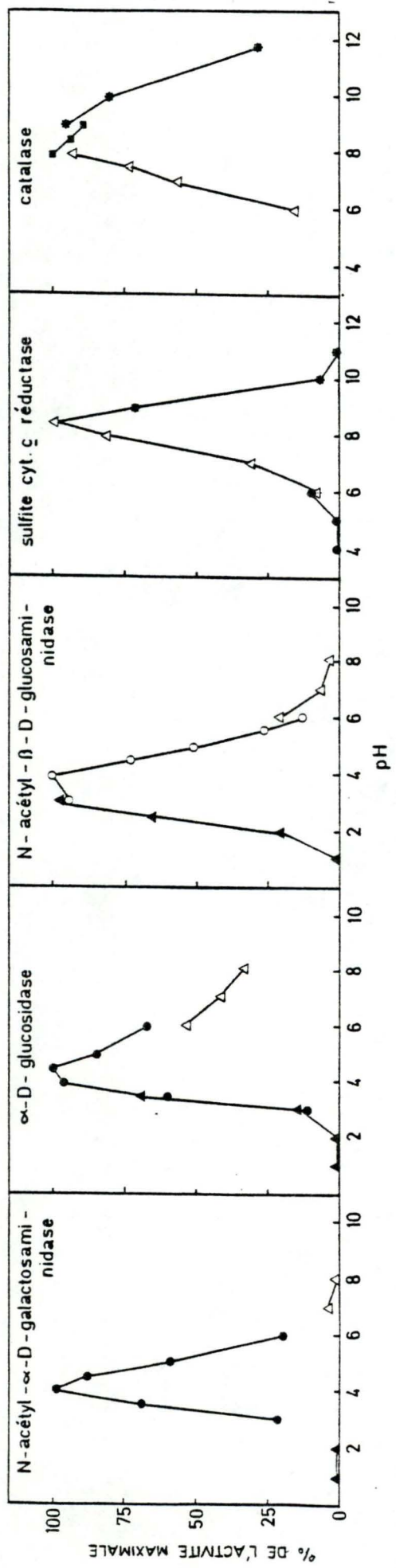


Figure 2.- Courbes d'activité des enzymes en fonction du pH, réalisées sur des homogénats de cellules WI-38. Le milieu d'incubation contenait les tampons suivant à une concentration 50 mM : acétate (●), citrate (○), phosphate (▲), imidazole-HCl (△), Tris-HCl (■), glycine-NAOH (□).

constaté que la moitié de son activité sédimentait avec les particules subcellulaires et pouvait être attribuée aux peroxysomes (Remacle et al., 1980).

2. Effet de la concentration en protéines

Pour tous ces enzymes, nous avons déterminé la zone de linéarité entre l'activité enzymatique et la quantité de protéines d'un homogénat cellulaire introduites dans le dosage (figure 3).

Nous testons aussi la validité du dosage enzymatique dans les conditions que nous avons déterminées plus haut.

Les quantités de protéines utilisées pour les différents dosages sont de l'ordre de 0,01 à 0,2 mg de protéines sauf pour le dosage de la NAD⁺Glu qui demande une quantité moindre de protéines (de 0,05 à $0,4 \times 10^{-3}$ mg de protéines).

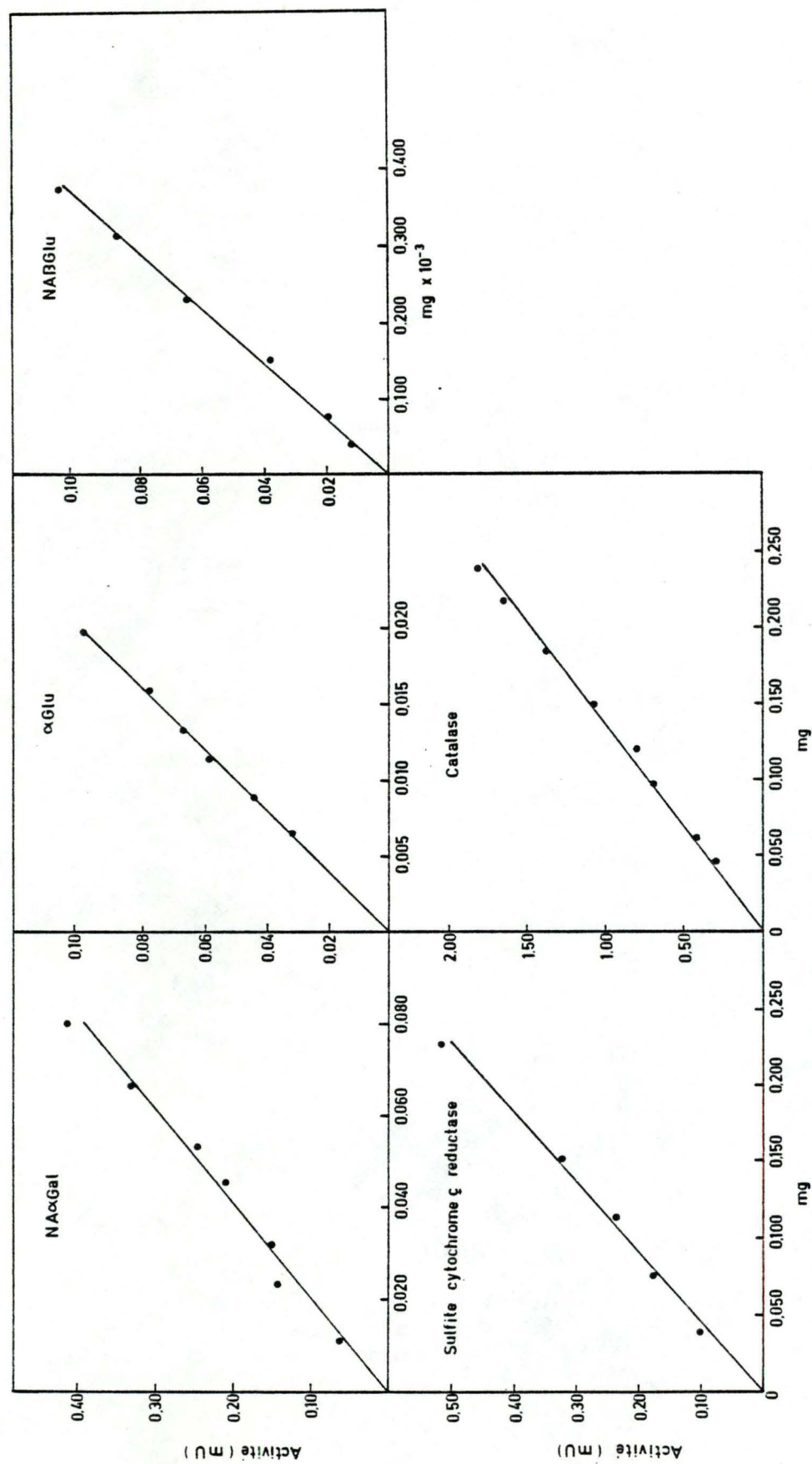


Figure 3.- Evolution de l'activité des enzymes en fonction de la concentration en protéines dans les conditions reprises à la table I.

IV. INACTIVATION DE L'ISOENZYME DE LA NAGlu

La NAGlu possède deux isoenzymes A et B (Robinson et Stirling, 1968).

L'isoenzyme A se différencie de l'isoenzyme B par la présence de plusieurs résidus d'acide sialique qui lui confèrent une charge plus négative. Il est aussi moins stable et s'inactive dès que le pH dépasse d'une unité le pH où son activité est optimale.

La figure 4 nous montre la stabilité de l'enzyme à 37°C en fonction du temps à pH acide et à pH neutre.

A pH 4, l'activité reste stable pendant au moins une heure, tandis que l'on perd 10 % de l'activité lorsque l'extrait cellulaire est incubé à pH 7. L'inactivation n'est pas graduelle, mais s'arrête après environ 30 minutes. L'activité résiduelle reste alors constante aussi bien pour les jeunes et les vieilles cellules WI-38 que pour les cellules WS-HMG.

Nous considérons donc que cette activité résiduelle correspond à l'isoenzyme B de la NAGlu. C'est celui-ci que nous doserons dans les expériences ultérieures.

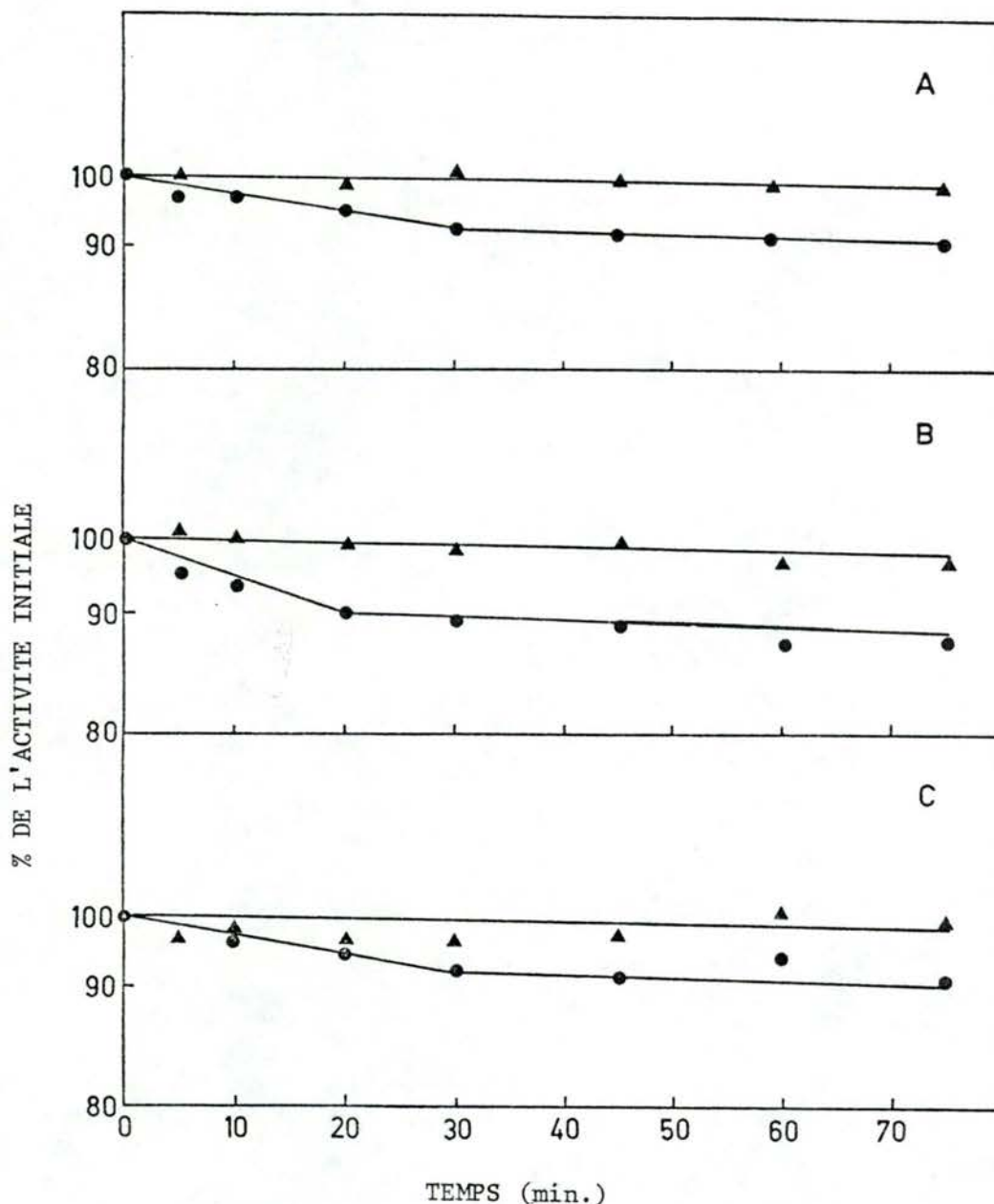


Figure 4.- Effet du pH sur l'inactivation de la N-acétyl- β -D-glucosaminidase. Trois cultures de cellules furent utilisées : en A cellules WI-38 jeunes (22ème génération) en B cellules WI-38 vieilles (45ème génération) et en C cellules WS-HMG. Les homogénats de ces cellules furent incubés à 37°C soit dans un tampon citrate 3mM pH 4 (▲), soit dans un tampon imidazole-HCl 3 mM pH 7 (●) contenant de l'albumine bovine à 0,1 %. Les essais enzymatiques furent effectués à pH 3,5 dans les conditions décrites à la table I.

V. COURBES DE THERMOLABILITE

La température habituelle de dénaturation des enzymes est d'environ 60°C. La figure 5 confirme ce fait et nous montre une forte diminution de l'activité des enzymes, lorsque ceux-ci sont incubés 30 minutes à des températures situées entre 50 et 60°C.

La NAGlu est cependant plus sensible et est complètement inactivée à 55°C.

Pour suivre l'inactivation des enzymes en fonction du temps, on choisit une température pour laquelle une inactivation d'au moins 50 % est obtenue après 30 minutes.

La table II présente les températures et les conditions d'incubation des enzymes étudiés.

La concentration de l'homogénat fut chaque fois ajustée de façon à permettre des dosages enzymatiques adéquats. De légères variations dans la concentration en protéines de l'homogénat n'affectent pas le taux de dénaturation des enzymes. Nous avons cependant ajouté de l'albumine comme agent protecteur lorsque de hautes dilutions de l'homogénat étaient demandées.

Notons que, dans de telles expériences, une grande importance est accordée aux contrôles de la température et du pH. En effet, étant donné que les enzymes se trouvent à la limite des conditions de dénaturation, de légères variations de leur environnement vont provoquer une accélération ou au contraire une décélération importante dans la vitesse de dénaturation.

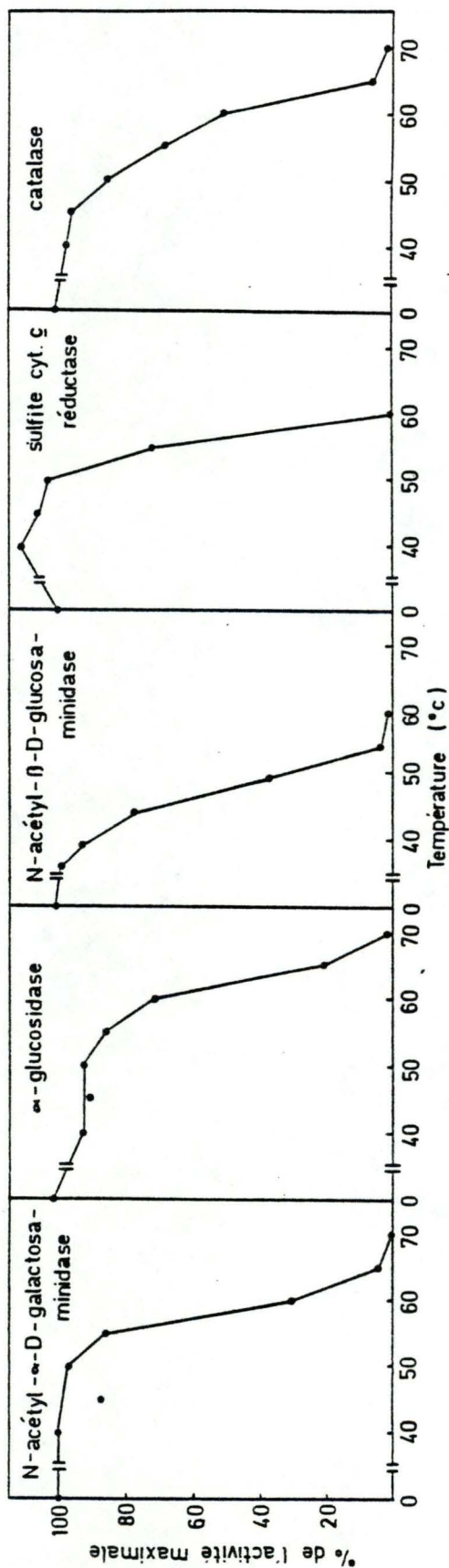


Figure 5.- Activité résiduelle des enzymes après incubation pendant 30 minutes à diverses températures. L'activité est mesurée sur l'homogénat cellulaire dans les conditions décrites à la table I et elle est exprimée en % de la préparation non incubée.

L'inactivation de la G6PD a été réalisée dans la solution B à 59°C et à 60°C en suivant la méthode de Holliday et Tarrant (1972).

Avant de procéder à l'inactivation de la NAD⁺Glu, l'extrait cellulaire se trouvant dans du sucrose (voir Méthodes chapitre II b) est dilué dans un tampon citrate 50 mM pH 3,5.

Les autres enzymes sont inactivés dans les solutions décrites dans le chapitre II b et reprises dans la table II.

Les courbes de thermolabilité sont obtenues de la manière suivante : l'homogénat ou l'extrait cellulaire est incubé dans les conditions définies ci-dessus ; à intervalles réguliers, des échantillons sont prélevés du milieu d'incubation. L'activité résiduelle est alors mesurée pour chaque point et portée en graphique en fonction du temps sur une échelle semi-logarithmique.

Les résultats des courbes de thermolabilité sont exprimés en pourcentage de l'activité enzymatique de départ. L'activité de départ étant le point de référence, elle sera déterminée par au moins trois dosages. Les autres points de la courbe d'inactivation seront testés en double.

Table II.- Conditions expérimentales pour les courbes d'inactivation

Enzymes testés	Gamme de concentration protéique de l'homogénat (mg ml ⁻¹)	Tampon	pH	autres constituants	Température d'incubation (°C)
N-acétyl- α -D-galactosaminidase	1-1,5	acétate 5 mM	4	albumine 1 mg ml ⁻¹	62
N-acétyl- β -D-glucosaminidase	0,003-0,005	citrate 50 mM	3,5	albumine 1 mg ml ⁻¹	49
α -D-glucosidase	0,1-0,15	acétate 10 mM	4,5	albumine 1 mg ml ⁻¹	63
Sulfite cytochrome c réductase	5-8	imidazole-HCl 3 mM	8,5	sucrose 0,25 M	58
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	1,5-2	Tris-HCl 50 mM	8	Mercaptoéthanol 1 mM EDTA 1 mM, acide Σ -amino-n-caproïque 1 mM ⁺ NADP ⁺ 1 mM	60 ou 59
Catalase	1-1,5	imidazole-HCl 3 mM	8	sucrose 0,25 M	62

VI. FRACTIONNEMENT DES CELLULES PAR CENTRIFUGATIONS DIFFERENTIELLES

La préparation et le fractionnement par centrifugation différentielle des cellules WI-38 jeunes et vieilles ont été décrits par Remacle et al. (1980).

Deux ou trois rollers sont lavés deux fois avec 20 ml de PBS. Les cellules sont détachées de la paroi de la bouteille à l'aide d'un petit racloir dans une solution de sucrose 0,25 M contenant de l'imidazole 3 mM, pH 7,4. La suspension cellulaire est centrifugée à 220 x g pendant 10 minutes. Le surnageant est enlevé par aspiration et le culot resuspendu avec 2,5 ml de sucrose 0,25M tamponné avec du Tris-HCl 25 mM à pH 7,4.

Les étapes suivantes se font à 4°C.

Les cellules resuspendues sont homogénéisées par 20 coups de piston serré dans un homogénéiseur Dounce.

Le fractionnement par centrifugation différentielle a été réalisé en suivant la méthode décrite par Amar-Costesec et al. (1974).

Trois fractions particulières (N, ML, P) et un surnageant final ont été séparés par centrifugations successives à vitesses et temps croissants.

La vitesse de rotation du rotor (rpm) et l'intégrale du carré des vitesses angulaires $W = \int_0^t \omega^2 dt$ ($\text{rad}^2 \text{s}^{-1}$) sont respectivement de 1700 et $1,9 \cdot 10^7$ pour la fraction nucléaire, 25.000 et $2,5 \cdot 10^9$ pour la fraction mitochondriale, 40.000 et $3 \cdot 10^{10}$ pour la fraction microsomiale.

Chaque fraction est resuspendue et homogénéisée par un homogénéiseur Dounce et lavée une fois; les surnageants sont

combinés pour la préparation de la fraction suivante. Les centrifugations ont été réalisées dans un rotor n° 40 Beckman, sauf pour la fraction nucléaire qui est préparée dans une centrifugeuse PRJ International (International Equipment Co Needham Heights, MA).

Les temps de centrifugation ont été calculés à partir de la valeur W , en tenant compte des distances entre l'axe du rotor et les deux extrémités du fluide dans le tube de centrifugation. Une grande importance doit être accordée aux temps de centrifugation qui sont très différents lorsque de petits volumes de solution sont centrifugés.

Les résultats du fractionnement calculés selon la méthode de Duve et al. (1955) sont présentés dans la figure 6.

Une comparaison a été établie entre les cellules jeunes et les cellules vieilles. Aucune différence marquante n'a été observée.

La cytochrome oxydase est un enzyme marqueur des mitochondries (de Duve et al., 1962); celles-ci sédimentent dans la fraction ML; la NAGlu, spécifique des lysosomes (Dillard et Tappel, 1974, et Tulkens et al., 1974) se retrouve également dans cette fraction.

La 5'-nucléotidase et la phosphodiesterase alcaline I sont associées aux membranes plasmiques dans le foie de rat (Coleman et al., 1967 et Emmelot et al., 1964). Ces deux enzymes semblent d'après leurs propriétés et leur comportement être représentatifs des membranes plasmiques chez les cellules WI-38. Elles sédimentent dans la fraction microsomiale.

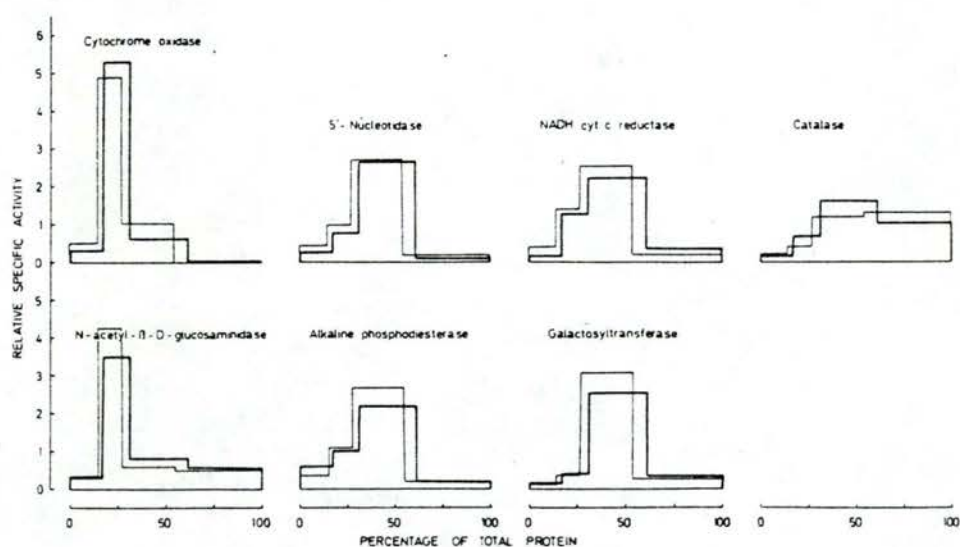


Figure 6.- Distribution des enzymes après fractionnement par centrifugation différentielle de jeunes (trait fin) et de vieux (trait gras) fibroblastes WI-38. Les fractions sont représentées dans un ordre croissant en fonction du coefficient de sédimentation de leurs composés subcellulaires; de gauche à droite, on trouve les fractions nucléaires (N), mitochondriales (ML), microsomiales (P) et le surnageant (S). En ordonnée, est reportée l'activité spécifique relative des fractions et en abscisse le pourcentage de protéines de chaque fraction. Les récupérations à partir de l'homogénat se situent entre 82 et 116 %.

(graphique repris de l'article Remacle et al., 1981)

La galactosyltransférase, enzyme typique de l'appareil de Golgi chez les cellules de foie de rat (Morré et al., 1969, et Fleischer et Fleischer, 1970), se retrouve également dans la fraction microsomiale.

Fowler et al. (1977) ont montré que la catalase, dans le rein et le foie de rat, est associée aux peroxysomes.

Dans les fibroblastes WI-38, nous constatons une activité de la catalase dans la fraction microsomiale.

Cet enzyme pourrait donc être également représentatif des peroxysomes pour les cellules que nous étudions. L'activité de la catalase n'est cependant pas négligeable au niveau de la fraction soluble dans laquelle on retrouve 35 à 45 % de l'activité enzymatique totale.

L'activité non mitochondriale de la NADH cytochrome c réductase pourrait être attribuée aux éléments dérivés du réticulum endoplasmique; on la trouve dans la fraction microsomiale.

VII. PURIFICATION DE LA G6PD

La purification de la G6PD a été réalisée selon la méthode de Kahn et Dreyfus (1974).

a) Préparation de l'extrait cellulaire

Les cellules (environ 18 mg de protéines) sont lavées et récoltées dans du PBS, centrifugées à 600 x g pendant 10 minutes et les culots sont resuspendus dans une solution (solution I) de phosphate de Na 10 mM tamponnée à pH 6 contenant du NADP⁺ 5×10^{-5} M, de l'acide ϵ -amino-n-caproïque 10^{-3} M, du mercaptoéthanol 10^{-3} M et de l'EDTA 10^{-3} M.

Les cellules sont homogénéisées dans un Dounce et les organites subcellulaires éliminés par centrifugation à 100.000 x g pendant 30 minutes.

b) Précipitation au sulfate ammonique

Toutes les étapes décrites par la suite sont réalisées à 4°C.

Le surnageant est soumis à une précipitation au sulfate ammonique à 37 % et pH 7. Après une centrifugation de 15 minutes à 15.000 x g, le culot obtenu est resuspendu dans la solution I contenant 1 mg/ml d'albumine.

c) Dialyse

Cette opération se fait pendant 4 heures contre la solution I.

d) Chromatographie sur carboxyméthyl Séphadex C-50

Après dialyse, l'extrait cellulaire est appliqué sur une

colonne (1,1 x 5 cm) de CM Séphadex C-50 équilibrée préalablement dans la solution I.

La colonne est ensuite lavée avec un tampon phosphate de Na 0,05 M pH 6 contenant de l'EDTA 10^{-3} M, de l'acide Σ -amino-n-caproïque 10^{-3} M et du mercaptoéthanol 10^{-3} M. Cette solution ne contient pas de NADP^+ .

Le lavage de la colonne se poursuit jusqu'à ce que toutes les protéines disparaissent de l'éluat.

L'addition de NADP^+ 2 mM à la solution de lavage permet l'élution de la G6PD. Des fractions de 4 ml sont récoltées et celles qui contiennent 80 % de l'activité de départ sont mélangées et additionnées de 3 mg d'albumine.

Une nouvelle précipitation au sulfate ammonique (56 %) est réalisée à pH 7. La suspension est centrifugée à 20.000 x g pendant 15 minutes. Le culot est resuspendu dans la solution B et dialysé 4 heures contre cette même solution.

Cette méthode de purification donne des résultats qui ne sont pas toujours reproductibles; deux problèmes se posent, d'une part l'enzyme s'inactive très facilement au cours de ces manipulations et d'autre part, il est parfois difficile d'éluer l'enzyme fixé sur la carboxyméthyl Séphadex.

Dans les meilleures conditions, nous avons pu obtenir une préparation enzymatique purifiée 10 à 12 fois comparée au surnageant de départ et représentant 20 à 25 % de l'activité.

VIII. ELECTROPHORESE DE LA G6PD

L'électrophorèse de la G6PD est réalisée selon la méthode de Dietz et Lubrano (1967).

Le gel de séparation est préparé à partir d'acrylamide 7 % et de NN'-méthylène-bisacrylamide 0,18 % dans un tampon Tris-HCl 0,4 M pH 8,9. La polymérisation est initiée par l'addition de NNN'N'-tétraméthyl éthylène diamine (2 mM) et de peroxydisulfate d'ammonium (0,07 %).

La solution est dégazée sous vide et coulée dans des tubes en verre d'un diamètre de 0,65 cm et d'une longueur de 7 cm, scellés à une extrémité. Les tubes sont remplis jusqu'à une distance de 0,8 cm de leur extrémité supérieure. De l'eau est ajoutée sur la solution avec précaution afin que, polymérisée, la surface du gel reste uniforme. La polymérisation dure une heure, elle est suivie de l'addition sur le gel de préparation d'un gel d'empilement nécessaire pour concentrer au maximum l'échantillon.

Le gel d'empilement est constitué de 2,5 % d'acrylamide et de 0,625 % de NN'-méthylène-bisacrylamide dans un tampon Tris-H₃PO₄ 60 mM pH 6,9 contenant 20 % de saccharose.

L'initiation de la polymérisation demande la présence de riboflavine (5 µg/ml).

La solution d'empilement est appliquée sur le gel de séparation sur une hauteur de 0,5 cm et recouverte d'H₂O. La polymérisation se fait durant une nuit à la lumière d'un tube néon.

Avant l'électrophorèse, l'eau surmontant le gel d'empilement est enlevée et l'échantillon contenant de 0,5 à 2 x 10⁻³ unités de G6PD est déposé sur le gel dans un volume de 10 à 50 µl.

Le reste du tube et la cuve cathodique sont remplis d'un tampon Tris 5 mM glycine 40 mM pH 8,3 contenant du NADP^+ 10^{-5} M.

L'électrophorèse se déroule à 4°C pendant une période de 2 heures 1/4 durant laquelle les tubes sont soumis à une intensité de 5 mA par tube et à une tension de 150 à 200 V.

Les gels sont ensuite enlevés des tubes et rincés dans de l'eau.

La G6PD est colorée spécifiquement à l'obscurité à 37°C par une solution Tris 0,01 M pH 8 contenant du glucose 6-phosphate 5 mM, du MgCl_2 2 mM, du NADP^+ 0,4 mM, du MTT 1,2 mM et du méthosulfate de phénazine 0,3 mM.

Après coloration, les gels sont lavés dans de l'eau distillée; la coloration est fixée en les immergeant dans de l'acide acétique 5 %. La lecture de l'intensité de la coloration se fait dans un photomètre type TRD3 Vernon, Paris, France.

RESULTATS

PREMIERE PARTIE - Thermolabilité d'enzymes appartenant à différents organites subcellulaires chez les fibroblastes WI-38 et WS-HMG.

I. ENZYMES DES CELLULES WI-38

(résumé des travaux publiés dans Nature 1978)

L'étude de la thermolabilité de divers enzymes a été réalisée sur deux lots de cellules (figure 7). Nous utiliserons le terme de "jeunes cellules" pour des cellules provenant de cultures ayant un nombre de passages compris entre 22 et 25 (G22-25); elles se trouvent dans la phase exponentielle de croissance appelée phase II suivant Hayflick (1965); elles ont accompli entre 46 et 53 % de leur durée de vie maximale.

Le terme de "vieilles cellules" sera réservé à des cultures ayant un nombre de passages compris entre 42 et 49 (G42-49); leur vitesse de croissance n'est plus exponentielle et elles se trouvent dans la phase de vieillissement appelée phase III par Hayflick (1965); elles ont accompli entre 89 et 96 % de leur capacité maximale de divisions.

Les IMC de ces deux populations de cellules sont donnés à la figure 1 en fonction du pourcentage de la capacité maximale de divisions des cellules.

Les courbes d'inactivation de la G6PD confirment les résultats déjà obtenus préalablement (Holliday et Tarrant, 1972). Chez les jeunes cellules, l'inactivation est une réaction du premier ordre qui se traduit par une droite lorsqu'on exprime l'activité en fonction du temps sur échelle semi-logarithmique.

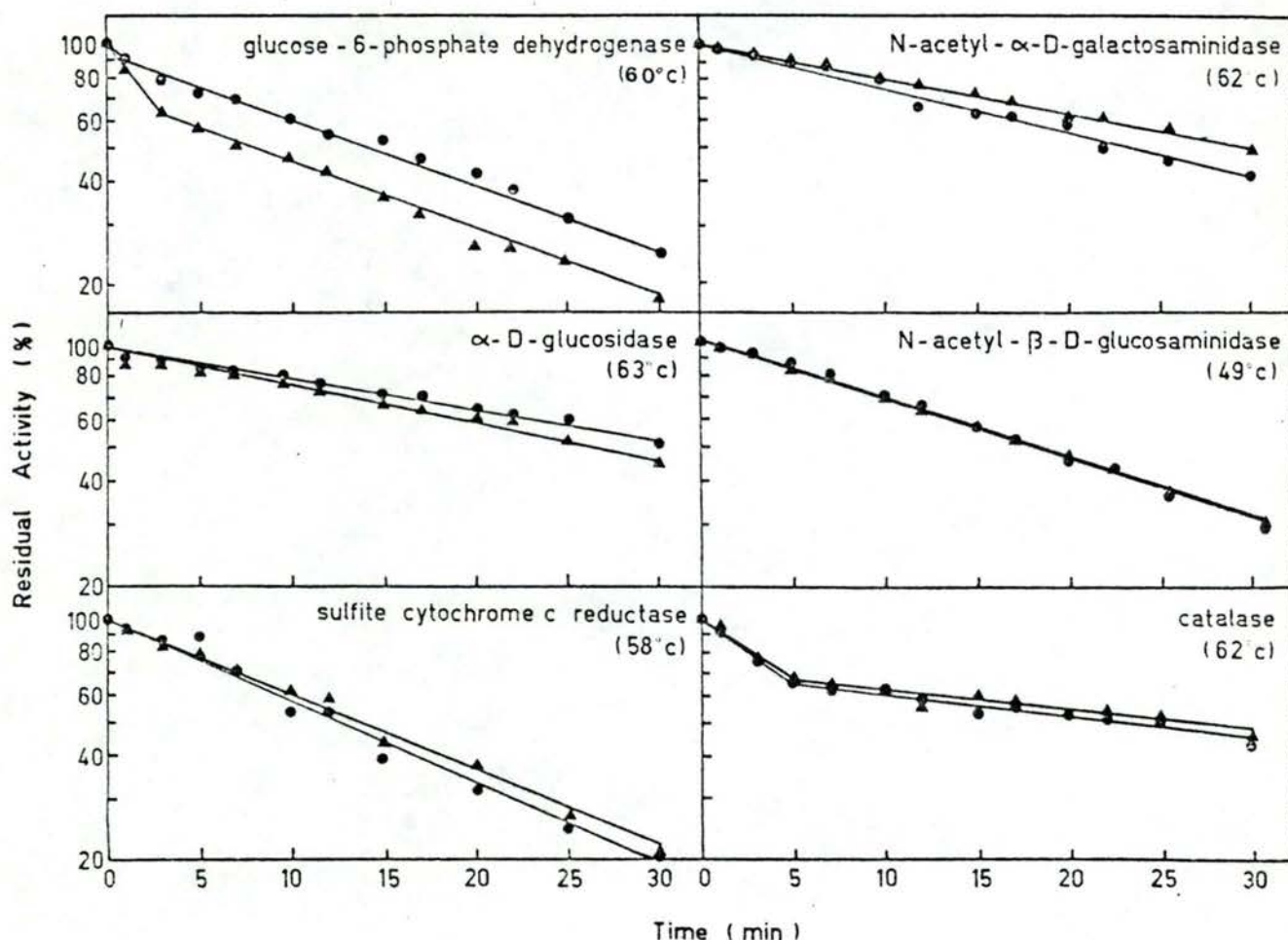


Figure 7.- Inactivation des enzymes des cellules WI-38 jeunes et vieilles.

Les homogénats furent préparés comme décrit dans les chapitres II et V des méthodes et furent chauffés à la température indiquée pour chaque enzyme. Des échantillons furent prélevés à divers temps d'incubation et l'activité fut mesurée comme décrit à la table I.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité de l'enzyme non incubé.

Cellules de la 22ème à la 25ème génération (●); cellules de la 42ème à la 49ème génération (▲).

Graphique repris de l'article de Nature (1978).

Pour les cellules vieilles, une cassure bien marquée apparaît dans cette courbe d'inactivation; son étude statistique montre un écart à la linéarité significatif ($P < 0,05$). Les valeurs expérimentales peuvent être "optimisées" par la superposition de deux exponentielles décroissantes : celle dont la pente est la plus forte représenterait le taux de dénaturation de la G6PD thermolabile, tandis que la seconde correspondrait à l'inactivation de l'enzyme normal. L'extrapolation, au temps zéro d'incubation, de la droite apparaissant après la cassure donne une estimation de la fraction enzymatique normale. Cette valeur soustraite de 100 % donne la proportion d'enzyme anormalement thermolabile; celui-ci représente 20 % de l'activité totale chez les cellules vieilles.

Pour les courbes de thermolabilité de l'isoenzyme B de la NA β Glu, de l' α Glu, de la NA α Gal et de la sulfite cytochrome c réductase, une droite est obtenue aussi bien pour les cellules jeunes que pour les vieilles (les écarts à la linéarité sont tous non significatifs). Les pentes des diverses droites dépendent fortement des conditions d'incubation et de légères différences apparaissent entre jeunes et vieilles cellules. Cependant, l'étude factorielle de la variance à deux critères de classification a montré que l'interaction temps-âge n'était pas significative pour ces enzymes, alors qu'elle était significative pour la G6PD ($P < 0,01$).

Les études électrophorétiques et de thermolabilité réalisées sur la catalase par Mainferme et Wattiaux (1980) ont montré le caractère hétérogène de cet enzyme dans le foie de rat.

Une telle hétérogénéité est sans doute responsable, chez les cellules WI-38, de la cassure observée dans la courbe d'inactivation.

Le même phénomène est observé chez les cellules jeunes et vieilles de sorte que la même quantité d'enzyme thermolabile est présente dans les deux populations cellulaires.

Les courbes d'inactivation des différents enzymes ont également été réalisées sur des cellules provenant de cultures ayant accompli 35 passages.

Nous avons obtenu des résultats identiques, excepté pour la G6PD dont la quantité d'enzyme thermolabile était de 13 %.

Toutes les expériences décrites ci-dessus ont été réalisées en double avec les mêmes résultats.

Nous concluons donc à une absence d'altération des enzymes lysosomiaux, mitochondriaux et probablement peroxysomiaux, tenant compte des limites de la méthode utilisée.

II. ENZYMES DES CELLULES WS-HMG

(résumé des travaux publiés dans *Experimental Gerontology*, 1980).

Les fibroblastes WS-HMG (provenant d'un individu atteint du syndrome de Werner) ont été testés à la génération 8.

L'étude de la thermolabilité a été réalisée sur cinq enzymes déjà étudiées chez les cellules WI-38 : la NA β Glu, l' α Glu, la NA α Gal, la sulfite cytochrome c réductase, et la G6PD.

Les courbes d'inactivation ont été réalisées suivant les conditions décrites dans les Méthodes (table II); les droites de régression calculées à partir des points expérimentaux sont montrées à la figure 8.

Les écarts à la linéarité sont non significatifs, excepté pour la G6PD ($P < 0,05$).

L'analyse statistique ne permet donc pas de déceler d'altération pour les trois enzymes lysosomiaux et l'enzyme mitochondrial.

Comme l'ont déjà montré Holliday et al. (1974), la courbe d'inactivation de la G6PD montre une cassure qui permet de déceler une fraction enzymatique thermolabile de 20 %.

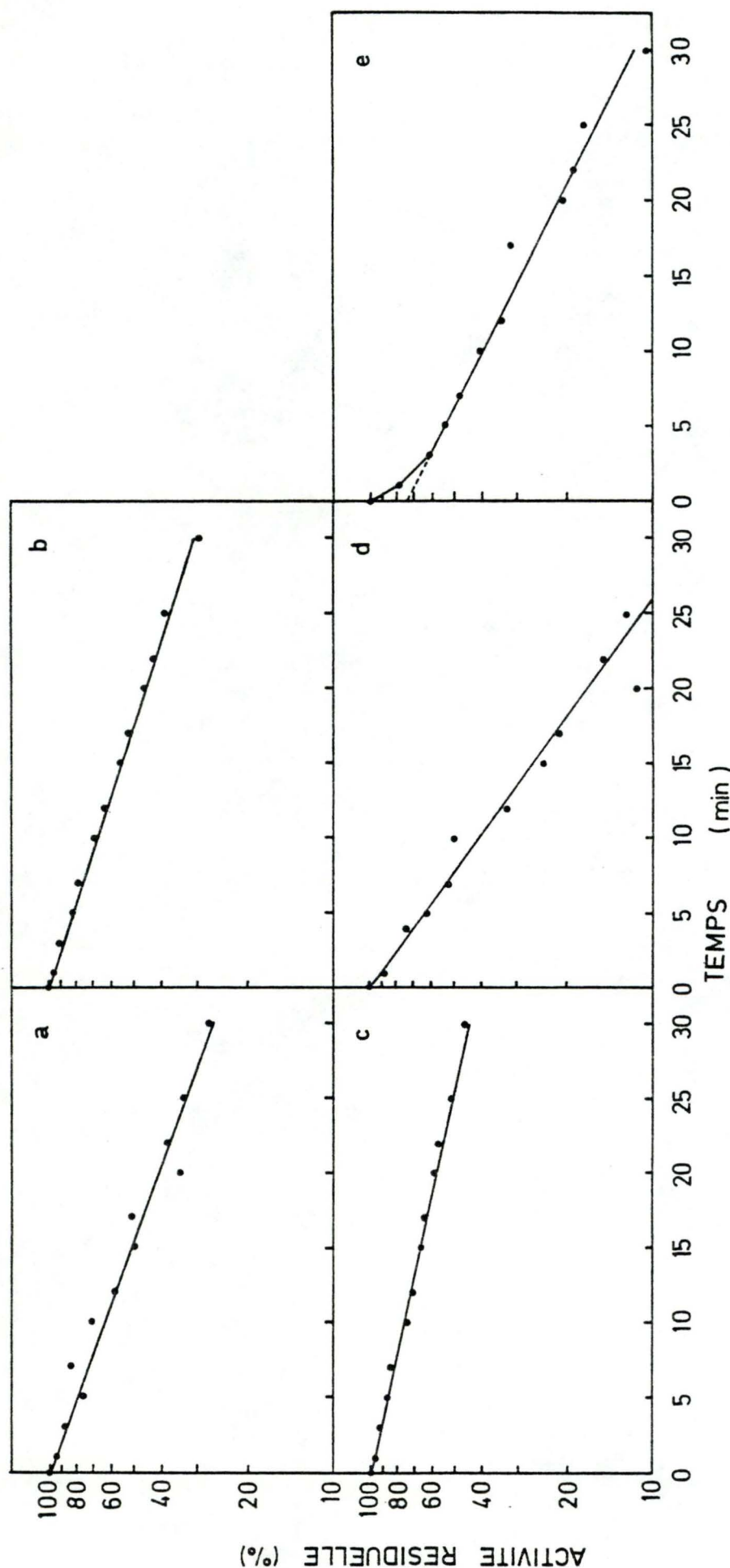


Figure 8.- Inactivation des enzymes des cellules WS-HMG (G8). Les homogénats furent préparés comme décrit dans les chapitres II et V des Méthodes. Des échantillons furent prélevés à divers temps d'incubation; l'activité résiduelle fut mesurée comme décrit à la table II et exprimée en pourcentage de l'activité initiale. Les points représentent la moyenne de deux résultats. Les droites de régression furent calculées et portées sur le graphique sauf en (e) où les deux premiers points n'interviennent pas dans le calcul de cette régression.

(a) Na α Gal à 49°C; (b) Na β Gal (isoenzyme B) à 63°C; (c) α Glu à 60°C; (d) sulfite cytochrome c réductase à 58°C; (e) G6PD à 60°C.

III. CONCLUSIONS

Les expériences réalisées sur les cellules WI-38 et sur les WS-HMG, bien qu'appartenant à deux modèles de vieillissement différents, nous conduisent à une conclusion commune : les mesures de thermolabilité de trois enzymes lysosomiaux et d'un enzyme mitochondrial indiquent qu'ils ne sont pas modifiés chez les cellules vieilles alors que plusieurs enzymes cytoplasmiques comme la G6PD, la 6-phosphogluconate déshydrogénase et l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase le sont chez ces deux types de cellules (Holliday et Tarrant, 1972, Lewis et Tarrant, 1972 et Goldstein et Moerman, 1975 a et b).

Ces résultats bien que ne pouvant pas être généralisés étant donné le petit nombre d'enzymes étudiées et l'utilisation d'un seul critère d'altération, suggèrent cependant une différence de comportement entre les enzymes du cytoplasme et ceux qui sont situés dans des organites subcellulaires. Nous nous sommes donc demandé s'il n'existerait pas des conditions particulières ou un "facteur" qui provoqueraient l'altération enzymatique de certains enzymes du cytoplasme; c'est sur cette hypothèse que nous avons développé les expériences présentées dans la deuxième partie de ce travail.

DEUXIEME PARTIE - Etude de l'altération de la G6PD
(Résumé des travaux publiés dans Arch. Int.
Physiol. Biochem. 1981),

I. APPARITION IN VITRO D'UNE ALTERATION DE LA G6PD

a) chez les cellules jeunes

Partant de l'hypothèse que l'altération de la G6PD fait intervenir un facteur physiologique et nous référant aux expériences de Kahn et al., (1976), nous nous sommes demandé s'il était possible d'induire chez les cellules jeunes une modification de la G6PD semblable à celle observée chez les cellules vieilles.

Après une série d'essais, nous avons réalisé l'expérience suivante.

Nous avons incubé des cellules entières (G26) détachées de leur support à 4°C dans un tampon Tris-HCl 25 mM, pH 7,4 contenant du NaCl 0,15 M (solution A).

A divers moments de l'incubation, nous avons prélevé un échantillon; celui-ci fut centrifugé à 220 x g durant 10 minutes afin d'obtenir un culot de cellules qui fut resuspendu avec la solution A dans un volume identique à celui de départ. Une solution concentrée fut ensuite ajoutée de manière à obtenir une concentration finale de Tris-HCl 50 mM, pH 8, 2-mercaptoéthanol 1 mM, EDTA 1 mM, acide ξ -aminon-caproïque 4 mM et NADP^+ 1 mM. La préparation fut alors soniquée et centrifugée et les différentes courbes d'inactivation réalisées.

Les courbes obtenues après 0 h, 30 minutes, 2 heures, 5 heures, 7 heures et 23 heures d'incubation à 4°C et à pH 7,4 sont montrées à la figure 9.

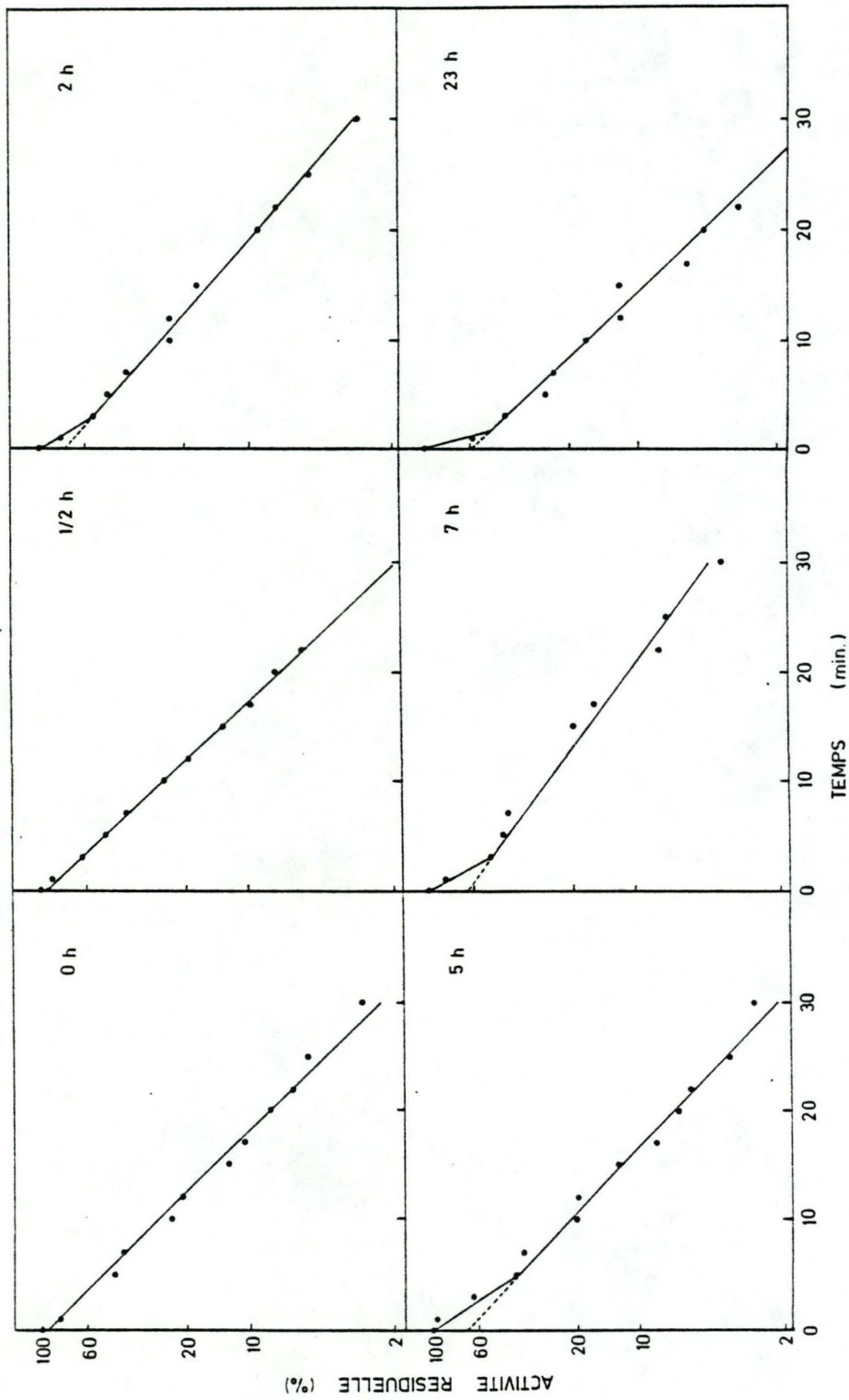


Figure 9.- Courbes d'inactivation à 60°C en fonction du temps de la G6PD présente dans une suspension de cellules jeunes à divers moments de son incubation à 4°C.
Les résultats sont exprimés comme aux figures 7 et 8.

On constate au fil du temps, l'apparition et l'augmentation d'une fraction enzymatique thermolabile; celle-ci atteint après 23 heures d'incubation, 40 % de l'activité de la G6PD mesurée.

La figure 10 A montre que la proportion de l'enzyme modifié augmente de façon considérable durant les 10 premières heures d'incubation, l'évolution est ensuite plus lente. L'apparition d'une altération enzymatique s'accompagne d'une forte inactivation de la G6PD qui atteint 98 % après 48 heures d'incubation (figure 10 B).

Des expériences similaires ont été réalisées sur un homogénat de cellules et un surnageant obtenu après centrifugation de cellules soniquées à 36.950 x g durant 30 minutes.

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites précédemment.

Une forme altérée de la G6PD apparaît également dans ces deux préparations (figure 10 A). Pour le surnageant, l'évolution est assez lente et seulement 25 % de l'enzyme est altéré après 48 heures d'incubation. Le comportement de l'homogénat est intermédiaire entre la suspension et le surnageant de cellules; 35 % de la G6PD est thermolabile après 48 heures.

La perte d'activité de l'homogénat et du surnageant se fait comme pour la suspension cellulaire de façon exponentielle; elle est cependant moindre pour ces deux préparations (figure 10 B).

Ces expériences ont été réalisées au moins quatre fois sur des cultures jeunes se situant entre la 25ème et la 38ème génération.

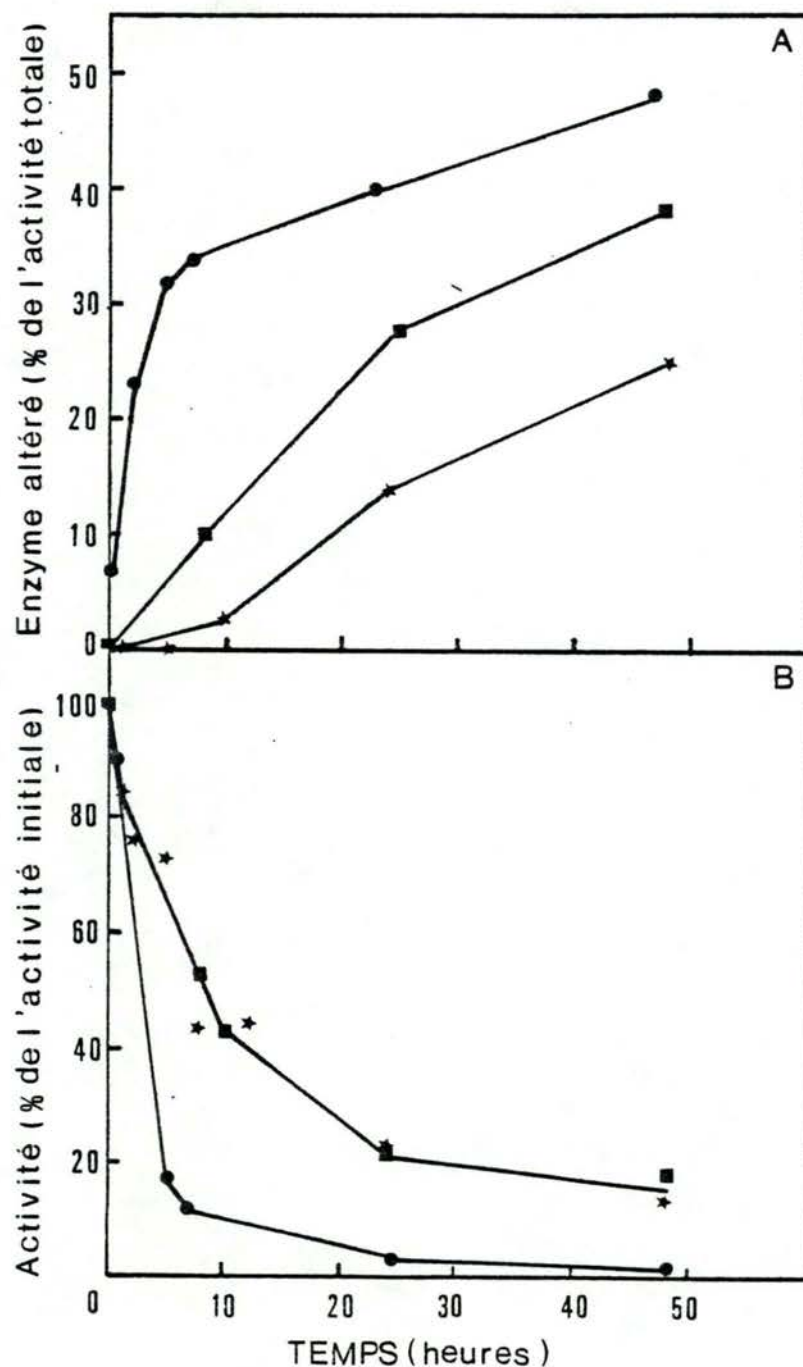


Figure 10.- Evolution de l'activité de la G6PD au cours de l'incubation de cellules (●), d'un homogénat (■) et d'un surnageant (★) de cellules jeunes (G 26-32) à 4°C. Le graphique indique en A la proportion d'enzyme thermolabile exprimée en % de l'activité totale au temps considéré et en B l'activité totale de l'enzyme en % de l'activité initiale.

Chaque fois, l'altération de la G6PD qui se traduit par la présence d'une forme thermolabile de l'enzyme, apparaît en quelques heures d'incubation à 4°C. Le pourcentage d'enzyme altéré après 24 heures ou 48 heures est toujours très important mais varie cependant d'une expérience à l'autre.

b) chez les cellules vieilles

Les cellules vieilles, comme nous l'avons vu dans la première partie des résultats, sont caractérisées par la présence de G6PD altérée représentant 20 % de l'activité enzymatique.

La figure 11 A montre que malgré l'existence au départ de cette fraction thermolabile, l'enzyme modifié après incubation d'un homogénat de cellules vieilles (dans les conditions décrites en Ia) atteint, comme pour les cellules jeunes, 50 % de l'activité enzymatique totale après 48 heures.

On remarque cependant que l'augmentation de la forme altérée ne se produit qu'après 10 heures d'incubation.

La diminution de l'activité totale peut, quant à elle, être comparée à celle obtenue pour les cellules jeunes (figure 11 B).

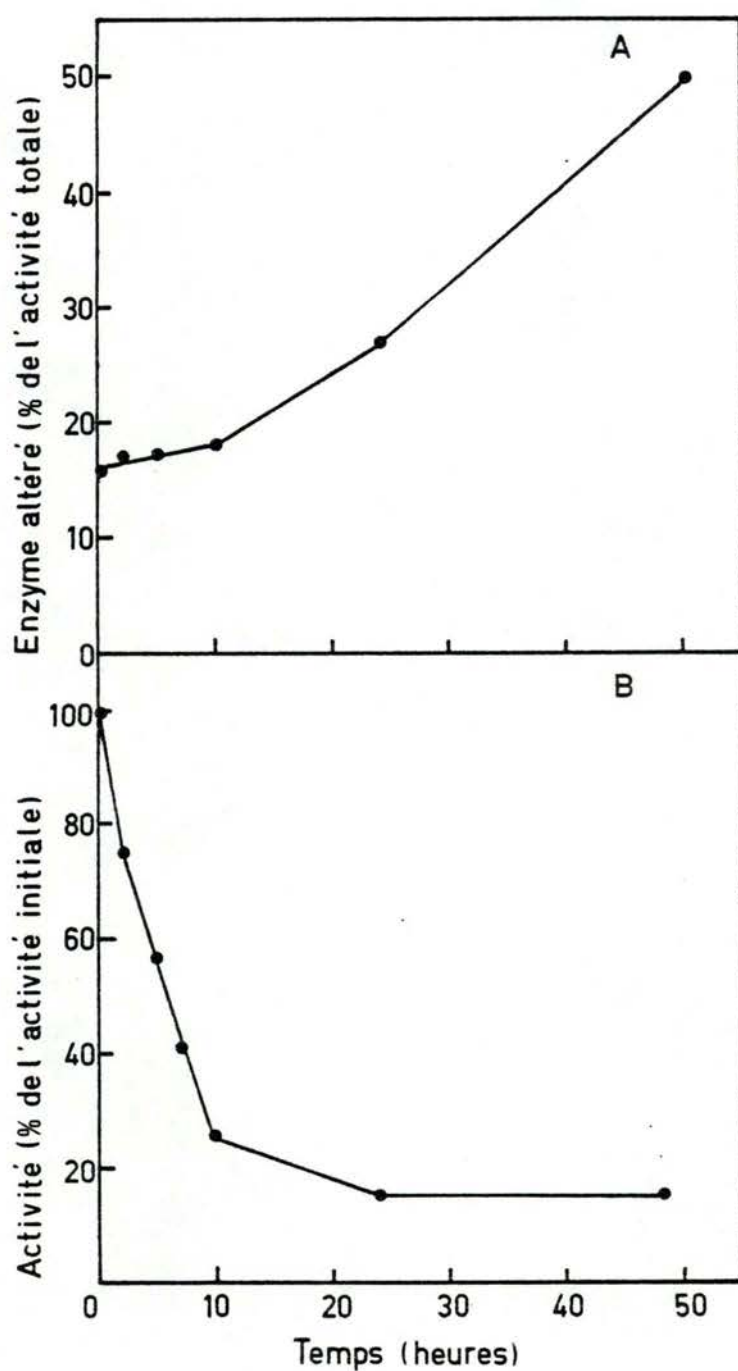


Figure 11.- Evolution de l'activité de la G6PD au cours de l'incubation d'un homogénat de cellules vieilles. Le graphique indique en A la proportion d'enzyme thermolabile exprimé en % de l'activité totale au temps considéré et en B l'activité totale de l'enzyme en % de l'activité initiale.

II. RECHERCHE DE FACTEURS INFLUENCANT L'APPARITION DE L'AL- TERATION ET L'ACTIVITE CHEZ LES CELLULES JEUNES

a) Incubation d'un homogénat de cellules jeunes en présence d'un jus de lysosomes

Les conditions d'incubation ont été choisies de façon à favoriser une action éventuelle des enzymes lysosomiaux sur la G6PD. L'homogénat de cellules jeunes fut donc incubé à 37°C dans une solution à pH acide.

Des cellules représentant 2,7 mg de protéines par ml furent resuspendues et homogénéisées au Dounce serré dans un tampon acétate 10 mM pH 5.

L'homogénat fut divisé en cinq lots de 3 ml auxquels furent ajoutés respectivement 0,2 ml d'H₂O (fractions 1 et 2), 0,2 ml d'une fraction soluble d'une préparation lysosomiale (fraction 3) et 0,2 ml de cette préparation lysosomiale portée préalablement à ébullition (fraction 4).

La fraction lysosomiale soluble (TS) fut préparée de la manière suivante : les lysosomes furent purifiés à partir de foie de rat suivant la méthode décrite par Trouet et al. (1974).

Les lysosomes isolés furent alors dialysés pendant 16 heures contre du tampon NaHCO₃ 1 mM, pH 7,4. La solution fut centrifugée à 25.000 rpm pendant 30 minutes dans le rotor 30 (Beckman). Le surnageant constitue la fraction TS. La préparation montrait une activité de la cathepsine D de 0,30 unité /ml et une concentration en protéines de 0,27 mg/ml.

Tableau III. - Incubation d'un homogénat de cellules dans différentes conditions.

		PH	Température	Temps (en h.)	% d'enzyme thermolabile
A	H	H ₂ O 1	4°C	0,17	0
	H	H ₂ O 2	37°C	0,17	0
	H	TS _b 3	37°C	0,17	0
	H	TS 4	37°C	0,17	0
	H	H ₂ O 5	37°C	0,17	20
B	H	-	4°C	0	0
	H	N	4°C	2	0
	H	ML	4°C	2	0
	H	P	4°C	2	0
	H	S	4°C	2	16
C	H	albumine	4°C	0	0
	H	-	4°C	24	17
	H	albumine	4°C	24	20

Les conditions pour la préparation de l'homogénat de cellules jeunes des diverses fractions N, ML, P, S obtenues par fractionnement de cellules vieilles et la fraction lysosomiale soluble (T S) sont décrites dans le texte.

TS_b : TS bouilli

Les préparations 2, 3 et 4 furent incubées 10 minutes à 37°C de même que la cinquième fraction dont les cellules furent reprises et homogénéisées dans la solution A à pH 7,4.

La préparation 1 considérée comme contrôle fut quant à elle laissée à 4°C.

Après 10 minutes, les cinq fractions furent additionnées de 0,5 ml d'une solution B (concentrée deux fois), soniquées et centrifugées selon les Méthodes (IIa).

Les courbes d'inactivation furent réalisées à 60°C et le pourcentage d'enzyme modifié calculé selon la méthode décrite dans la première partie des Résultats (chapitre I). Les conditions et les résultats de l'expérience sont repris en table III-A.

Aucune altération n'apparaît pour la G6PD incubée seule à pH 5 et en présence d'un jus de lysosomes ou d'un jus de lysosomes bouilli.

Par contre une fraction altérée est retrouvée dans l'homogénat incubé 10 minutes à pH 7,4.

En conclusion, l'on ne peut pas déceler d'effet direct des enzymes lysosomiaux sur la G6PD; par contre une variation de pH pourrait influencer l'apparition d'enzymes altérés; ce phénomène sera étudié systématiquement dans le chapitre IIId.

b) Incubation d'un homogénat en présence de différentes fractions N, ML, P, S isolées de cellules vieilles

Il était intéressant de savoir si l'altération de la G6PD pouvait être favorisée par un facteur se trouvant dans l'un ou l'autre organe des cellules vieilles.

Un homogénat de cellules jeunes (G 26) fut incubé deux heures dans la solution A à 4°C en présence des fractions N, ML, P, S obtenues par centrifugation différentielle d'un homogénat de cellules vieilles (G 47) (Méthodes ch. VI.).

Pour libérer le contenu des organites, les fractions furent traitées 4 fois pendant 30 secondes à l'ultraturax.

Le volume des fractions ajoutées à l'homogénat fut calculé de façon que la quantité d'organite ramenée à l'homogénat soit identique dans chaque test. Le volume des tubes fut alors ajusté à une même valeur avec la solution A.

Après deux heures d'incubation à 4°C, la solution B concentrée fut ajoutée de façon que sa concentration finale soit égale à 1 et les courbes d'inactivation furent réalisées à 60°C.

Les conditions d'incubation et les résultats sont repris dans la table IIIB.

Le pourcentage d'enzyme modifié est nul dans tous les tests effectués sauf lorsque l'homogénat de cellules jeunes est incubé en présence d'un surnageant de cellules vieilles.

Cet effet doit cependant être nuancé : le surnageant "vieux" possède lui-même 20 % d'enzyme modifié. Connaissant l'activité enzymatique appartenant au surnageant vieux et celle provenant de l'homogénat jeune, l'on peut calculer que 5 % de l'activité enzymatique provenant de l'homogénat jeune aurait été rendue thermolabile par cette incubation. Cette valeur est faible et à la limite de résolution de la technique.

En résumé, aucune des fractions N, ML, P obtenues à partir de cellules vieilles ne semble favoriser l'apparition d'une fraction thermolabile de la G6PD provenant de cellules jeunes. D'après ces résultats, le surnageant pourrait jouer un rôle dans l'altération de l'enzyme.

c) Incubation d'un surnageant en présence d'albumine

La présence dans un milieu d'incubation d'une quantité plus ou moins grande de protéines peut influencer la vitesse de dénaturation d'un enzyme.

Nous avons voulu savoir si la présence d'une concentration élevée en protéines pouvait influencer l'apparition du phénomène d'altération de la G6PD. Un surnageant de cellules jeunes fut incubé dans la solution A en présence d'une concentration finale en albumine de 2 mg/ml. Les résultats de la table III C montrent que la présence d'albumine n'empêche pas l'apparition d'une fraction thermolabile de la G6PD.

Celle-ci représente, comme dans le cas d'une incubation sans albumine, environ 20 % de l'activité de la G6PD après 24 h. d'incubation à 4°C.

d) Influence du pH

Dans le paragraphe a, nous avons mis en évidence une différence de comportement de la G6PD, selon que l'on incubait un homogénat de cellules à pH 5 ou à pH 7,4. Cette influence du pH fut alors étudiée systématiquement dans les expériences décrites ci-dessous.

1. Evolution de l'activité de la G6PD lors de son incubation à différents pH

Les cellules sont préparées comme indiqué au chapitre IIa des Méthodes. Après l'étape de centrifugation à 220 g, le culot est resuspendu dans une solution de Tris-HCl 5 mM pH 7,4 contenant du NaCl 0,15 M.

La suspension est homogénéisée et divisée en plusieurs fractions auxquelles sont ajoutés différents tampons (50 mM) contenant du NaCl 0,15 M.

Le pH final de chaque préparation est vérifié avant l'incubation à 4°C.

Après 24 heures, une solution B concentrée est ajoutée à chacun des tests de manière à obtenir une concentration finale égale à un. Ceux-ci sont centrifugés à 300.000 g durant 30 minutes.

La G6PD est dosée sur le surnageant et son activité exprimée en % de l'activité de l'enzyme non incubé (figure 12). Lorsqu'elle est incubée 24 heures à pH 5, la G6PD garde 80 % de son activité de départ. Par contre, une inactivation considérable est constatée lorsque le pH s'élève au-delà de 6,5; à partir de pH 8, l'activité résiduelle après 24 heures est insignifiante.

La même expérience fut réalisée sur l'enzyme purifié (voir Méthodes). Celui-ci fut incubé en présence de 1 mg/ml d'albumine, dans les mêmes conditions que l'homogénat. A l'opposé des résultats obtenus pour l'homogénat, l'activité de l'enzyme pur reste constante après 24 heures d'incubation dans la zone de pH étudiée.

En résumé, on constate une forte influence du pH sur la G6PD qui voit son activité diminuer aux pH plus basiques. Cependant, l'effet du pH se marque lorsque la G6PD se trouve dans un homogénat mais non lorsque l'enzyme est pur. Ce fait laisserait supposer l'existence dans l'homogénat d'un facteur dont l'action de déstabilisation de l'enzyme varierait en fonction du pH.

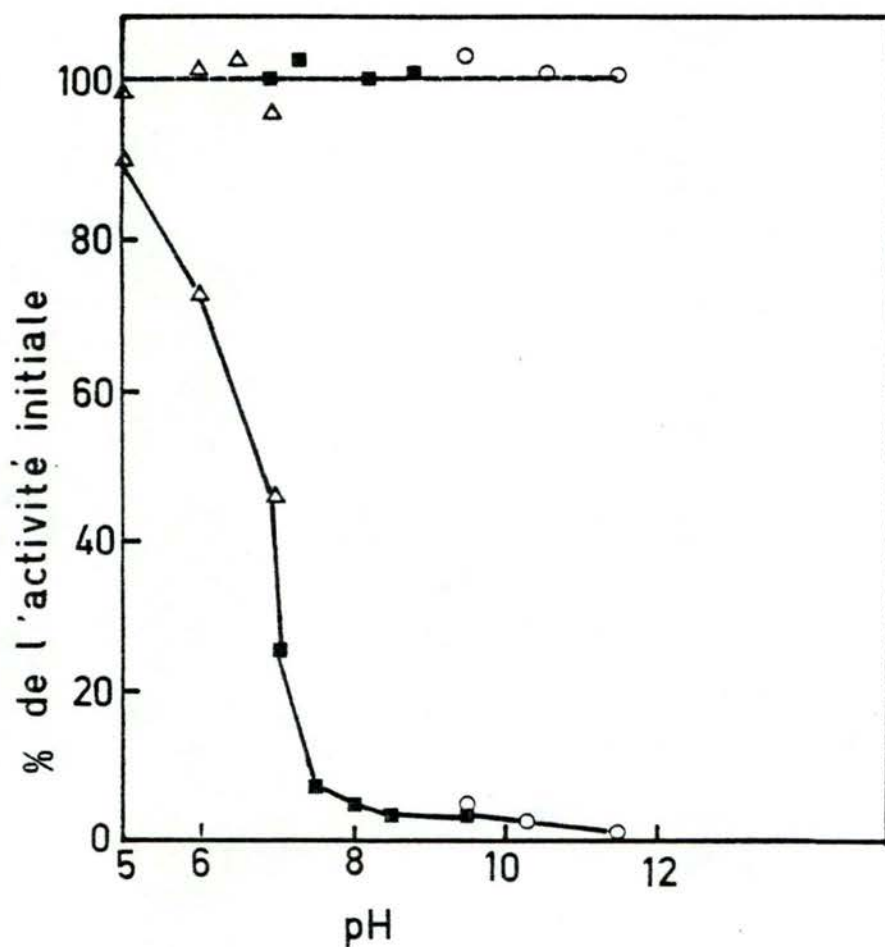


Figure 12.- Activité de la G6PD après 24 heures d'incubation dans des solutions tamponnées à différents pH :
 (Δ) tampon phosphate, (■) tampon Tris-HCl, (○) tampon glycine.
 L'activité est exprimée en pourcentage de l'activité de l'enzyme non incubé; l'enzyme contenu dans l'homogénat est représenté par un trait plein; l'enzyme pur est représenté par trait discontinu.

2. Etude des courbes de thermolabilité de la G6PD
après incubation à pH 6,5 et à pH 7,4

Une suspension, un homogénat et un surnageant de cellules ont été incubés à 4°C dans un tampon Tris-HCl 25 mM à pH 6,5 et 7,4 contenant du NaCl 0,15 M. Après 24 heures et 48 heures, l'activité fut mesurée et les courbes d'inactivation furent réalisées à 59°C afin de déterminer le pourcentage d'enzyme thermolabile. Les résultats sont présentés à la figure 13.

L'incubation à pH 6,5 comme nous l'avons constaté ci-dessus, réduit la perte d'activité de l'enzyme pour les trois préparations; en même temps, elle prévient l'apparition de la forme thermolabile.

Un pH plus acide aurait donc un effet protecteur sur la G6PD et préviendrait aussi bien son inactivation que son altération.

e) Influence du NADP^+

Une propriété typique de la G6PD est son association étroite avec le NADP^+ pour former un complexe apoenzyme-coenzyme.

En plus du rôle catalytique que lui confère sa qualité de coenzyme, le NADP^+ interviendrait dans une stabilisation structurale de la G6PD (De Flora et al., 1974).

C'est pourquoi, il nous a semblé opportun d'étudier l'influence de cette molécule sur l'activité et l'altération de la G6PD des fibroblastes WI-38.

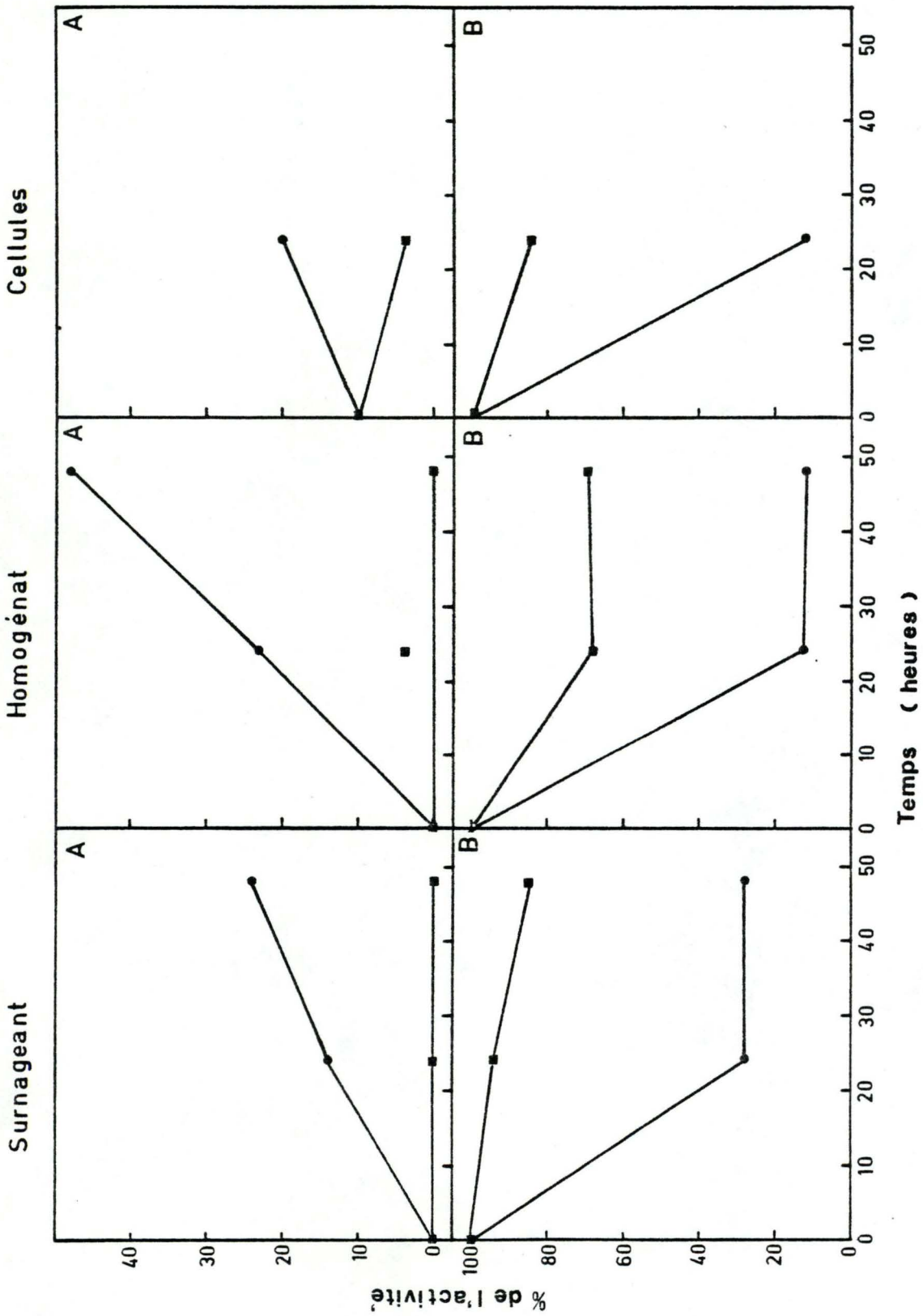


Figure 13.- Evolution de la G6PD au cours de l'incubation d'un surnageant, d'un homogénat et d'une suspension de cellules jeunes à 4°C. L'incubation a été réalisée dans un tampon Tris-HCl 25 mM, pH 6,5 (■) et pH 7,4 (●) contenant du NaCl 0,15 M. Le graphique indique en A la proportion d'enzyme thermolabile exprimé en pourcentage de l'activité totale au temps considéré, en B l'activité totale de l'enzyme en pourcentage de l'activité initiale.

1. Evolution de l'activité de la G6PD lors de son incubation en présence de diverses concentrations en NADP^+

La figure 14, montre l'évolution de l'activité de la G6PD lorsqu'un homogénat de cellules jeunes est incubé à 4°C dans une solution A contenant diverses concentrations en NADP^+ .

L'enzyme incubé en présence de $\text{NADP}^+ 10^{-3}$ M garde son activité constante après 48 heures. Pour des concentrations plus basses, l'activité est maintenue durant une période d'autant plus restreinte que la concentration en NADP^+ est faible.

L'enzyme est protégé durant 8 heures pour une concentration de départ de 10^{-4} M en NADP^+ et seulement pendant 30 minutes pour une concentration de 10^{-5} M.

Cette période est suivie d'une inactivation rapide de l'enzyme.

A 10^{-6} M, le NADP^+ ne protège plus la G6PD et l'inactivation intervient comme pour le contrôle, dès l'incubation à 4°C .

On constate également une diminution de la quantité de NADP^+ au cours du temps. Cette évolution est lente lorsque le milieu contient au départ une concentration de 10^{-3} M en NADP^+ , une perte de 15 % est observée après 48 heures. En valeur absolue, cela représente une diminution de la concentration en NADP^+ de $1,5 \times 10^{-4}$ M.

Si donc, au départ, la concentration en NADP^+ est de 10^{-4} M, on peut s'attendre à ce que la molécule soit rapidement consommée. C'est ce que l'on constate à la figure 14 : après 7 1/2 heures d'incubation, on ne retrouve plus de NADP^+ dans le milieu. Notons que c'est au moment où la concentration en NADP^+ devient pratiquement nulle que l'inactivation de la

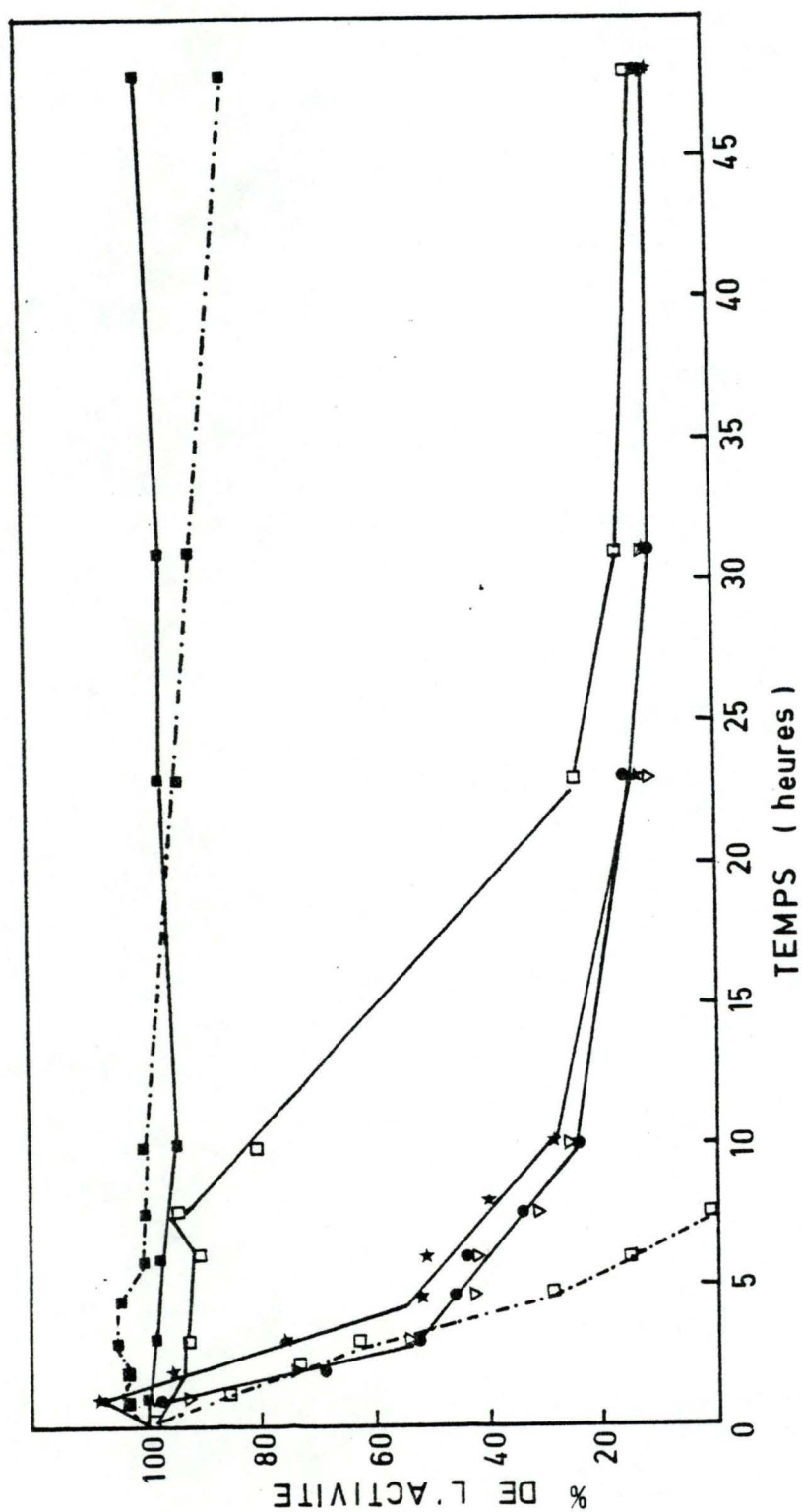


Figure 14.- Evolution en fonction du temps de l'activité de la G6PD (trait plein) et de la concentration en NADP⁺ (trait discontinu) d'un homogénat de cellules jeunes incubé seul (●) et en présence de NADP⁺ 10⁻³ M (■), 10⁻⁵ M (▲) et 10⁻⁶ M (▽).
L'activité de la G6PD et la concentration en NADP⁺ sont exprimées en pourcentage des valeurs mesurées avant l'incubation.

G6PD prend cours. La disparition du NADP^+ ne s'explique pas par une réduction de ce dernier car la quantité de NADPH reste insignifiante dans toutes ces expériences.

Cette expérience nous montre que le NADP^+ exerce un effet protecteur sur l'activité de la G6PD et qu'il est graduellement consommé dans un homogénat de cellules maintenu à 4°C.

2. Evolution de la thermolabilité de la G6PD en présence de NADP^+

Un homogénat de cellules jeunes fut incubé 24 heures à 4°C dans la solution A à pH 7,4 en présence d'une concentration de NADP^+ 1 mM.

La figure 15 montre deux courbes d'inactivation de la G6PD à 59°C.

L'une représente la thermolabilité de l'enzyme incubé seul et se caractérise par une cassure qui atteint 50 % de l'activité mesurée après 24 heures; l'activité totale à ce moment ne représente plus que 15 % de celle du départ. Par contre, l'enzyme incubé en présence de NADP^+ conserve son activité à 96 % et ne montre aucune altération : son inactivation à 59°C se déroule de façon linéaire en échelle semi-logarithmique.

Le NADP^+ , s'il protège la G6PD contre son inactivation, la protège également contre son altération. Un effet similaire est observé lorsque du NADPH est ajouté au milieu d'incubation au lieu du NADP^+ (résultats non montrés).

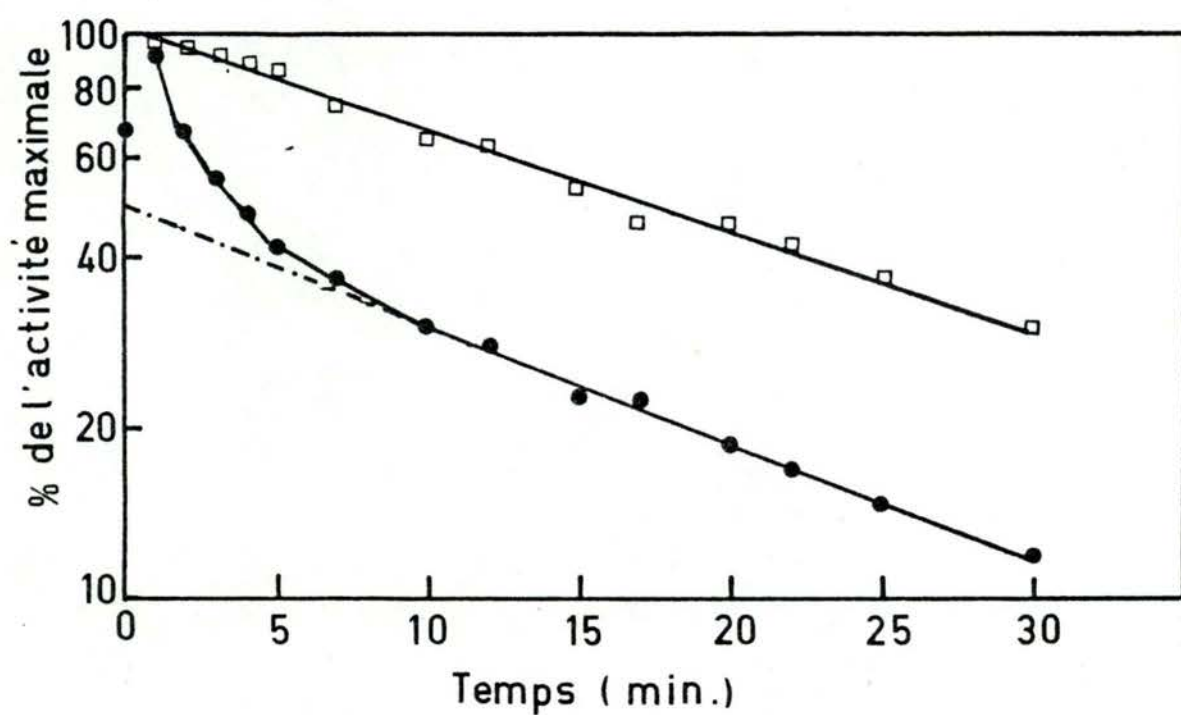


Figure 15.- Courbes d'inactivation à 59°C de la G6PD provenant d'un homogénat de cellules jeunes incubé pendant 24 heures, seul (●) et en présence de NADP⁺ 1 mM (□). L'activité est exprimée en pourcentage de l'activité maximale.

3. Etude du comportement électrophorétique de la G6PD incubée en présence de NADP^+

L'électrophorèse de la G6PD montre deux bandes d'activité correspondant aux formes tétramériques et dimériques de l'enzyme. Lorsque la G6PD contenue dans un homogénat de cellules jeunes est incubée 24 heures à 4°C , la forme dimérique subsiste alors que la forme tétramérique est à peine décelée dans les gels (figure 16).

Par contre, les deux formes sont conservées lorsque la G6PD est incubée en présence de NADP^+ (1mM). Le NADP^+ permet donc à la G6PD de se maintenir sous forme tétramérique. Notons encore que le même effet peut être obtenu en utilisant du NADPH 1 mM.

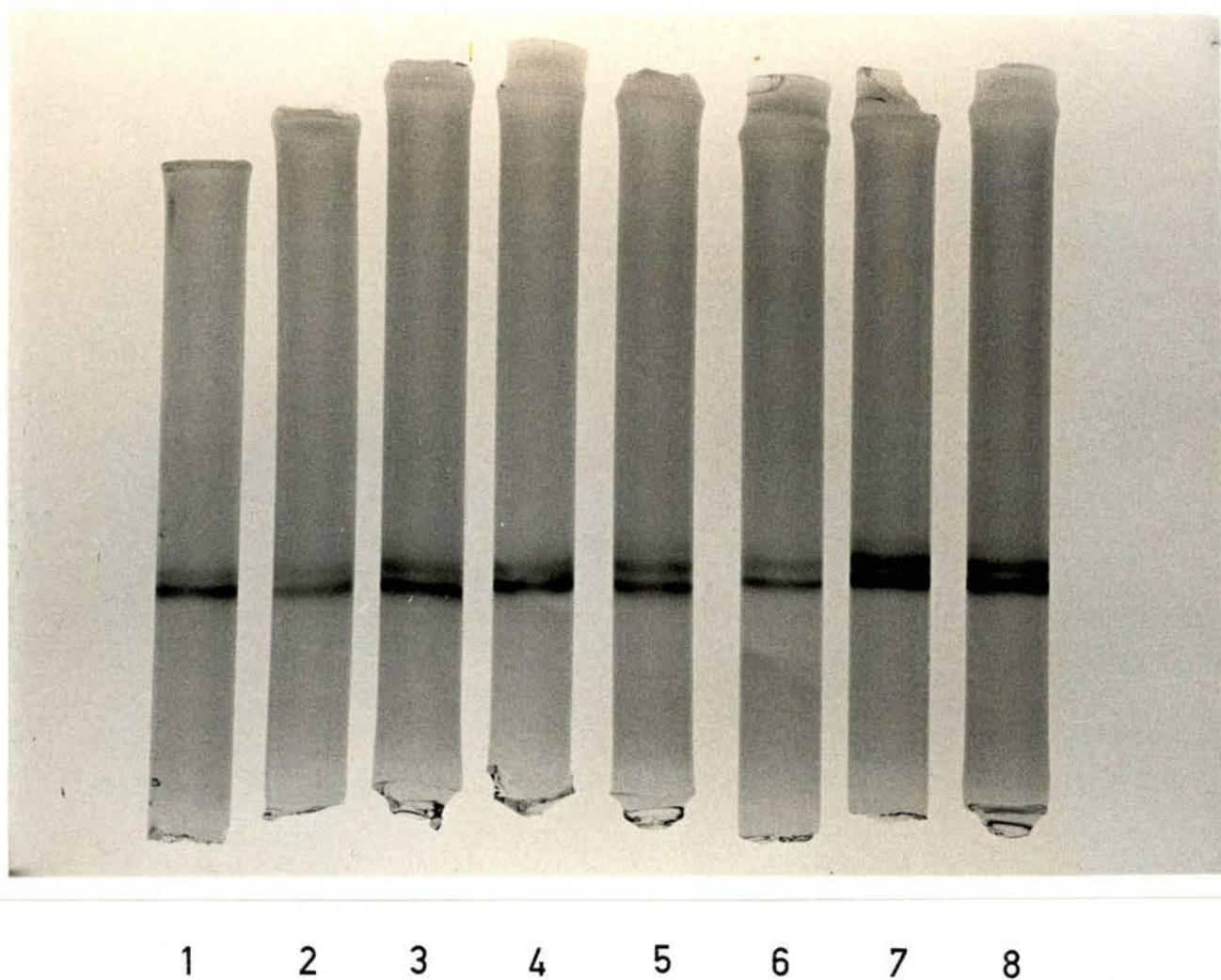


Figure 16.- Electrophorèses de la G6PD après incubation d'un homogénat pendant 24 heures, à 4°C, seul (1-2), en présence de NADP^+ 1 mM (3-4), en présence de NADPH 1 mM (5-6) et en absence d'incubation (7 et 8).
Notons la disparition de la forme tétramérique dans les gels 1 et 2.

III. REVERSIBILITE DU PHENOMENE D'ALTERATION

Dans les deux chapitres précédents, nous avons vu qu'une altération de la G6PD semblable à celle apparaissant chez les cellules vieilles, pouvait être obtenue chez les cellules jeunes. Cette altération s'accompagne toujours d'une inactivation de l'enzyme. Ces deux modifications peuvent être inhibées par un milieu d'incubation contenant du NADP^+ ou ayant un pH plus acide.

Il était intéressant de savoir si l'altération et l'inactivation apparues chez les cellules jeunes après incubation in vitro et présentes naturellement chez les cellules vieilles pouvaient être réversibles en présence de NADP^+ ou d'un pH plus acide.

a) Etude de la réversibilité de l'altération chez les cellules jeunes

1. Par acidification du milieu d'incubation

Afin d'étudier l'influence d'un milieu plus acide sur la G6PD altérée, nous avons provoqué préalablement cette altération en incubant pendant 24 heures à 4°C un surnageant de cellules jeunes (voir chapitre Ia.)

Le pH de la solution qui était de 7,4 pendant l'incubation, est abaissé à 6,5; l'activité et la proportion de la G6PD thermolabile sont alors suivies au cours du temps. Les résultats sont présentés à la figure 17.

L'incubation en milieu plus acide réduit considérablement la proportion d'enzyme thermolabile. Celle-ci qui était de 50% après la première incubation diminue graduellement au cours du temps pour atteindre 5 % après 48 heures d'incubation à pH 6,5.

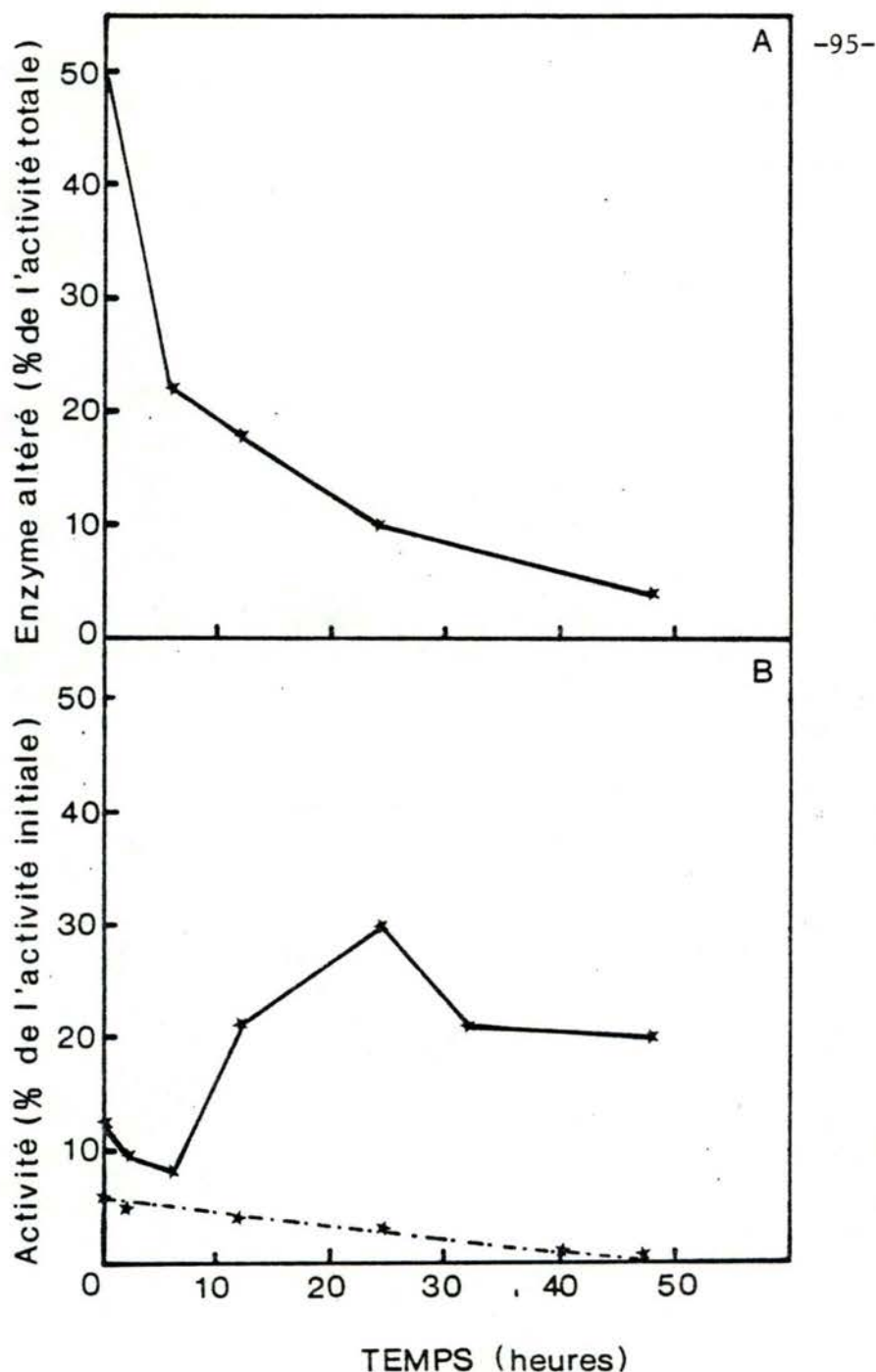


Figure 17.- Effet d'un pH plus acide sur une préparation contenant de la G6PD altérée et inactivée in vitro. Un surnageant provenant de cellules jeunes a été incubé pendant 24 heures à 4°C et à pH 7,4. A ce moment, (temps 0), le pH est amené à une valeur de 6,5 et l'effet du changement de pH est mesuré

A. en déterminant la proportion d'enzyme thermolabile exprimée en pourcentage de l'activité de la G6PD au temps déterminé

B. en mesurant l'activité de la G6PD totale (B trait plein) et l'activité de la G6PD thermolabile (B trait discontinu) exprimées en pourcentage de l'enzyme dans les cellules avant la première incubation.

La forme thermolabile disparaît également progressivement lorsque les résultats sont exprimés en valeur absolue (figure 17B).

Parallèlement, l'activité enzymatique est partiellement restaurée. Le regain d'activité n'atteint généralement pas plus de 30 % de l'activité qui existait dans les cellules de départ (figure 17 B). Des résultats analogues ont été obtenus pour un homogénat de cellules.

L'acidification du milieu d'incubation peut donc réactiver partiellement la G6PD et faire disparaître la modification induite chez les cellules jeunes.

2. Par addition de NADP^+ dans le milieu d'incubation

L'altération de la G6PD a été provoquée comme dans le paragraphe précédent en incubant un surnageant et un homogénat (résultats non montrés) de cellules jeunes à pH 7,4 et 4°C.

Après 24 heures, de la solution B concentrée fut ajoutée au milieu d'incubation de façon que sa concentration finale soit de 1. La concentration en NADP^+ a été augmentée de sorte qu'elle soit de 5 mM dans la préparation finale.

Cette dernière fut incubée à température ambiante; l'activité et le pourcentage d'altération de la G6PD furent mesurés au fil du temps. L'activité qui n'était plus que de 20 % de l'activité initiale, est totalement récupérée après 12 heures d'incubation (figure 18 B).

En même temps, la fraction altérée (calculée en pourcentage de l'activité mesurée au temps considéré) diminue très rapidement pour ne plus atteindre que 3 % de l'activité de la G6PD après 6 heures d'incubation en présence de NADP^+ (figure 18 A).

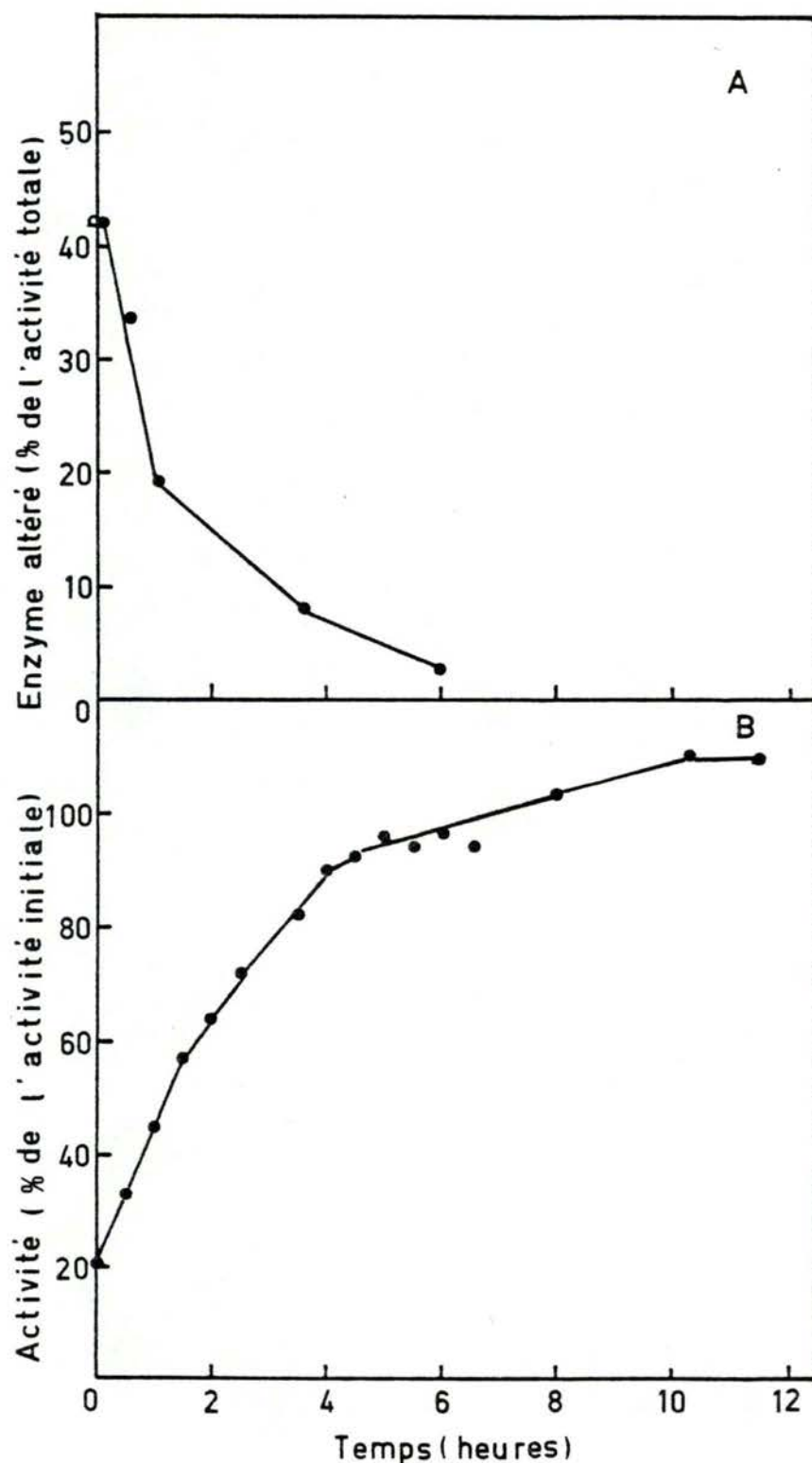


Figure 18.- Effet du NADP^+ 5 mM sur une préparation contenant de la G6PD altérée et inactivée.

Un surnageant de cellules jeunes a été incubé pendant 24 heures à 4°C et à pH 7,4. A ce moment (temps 0), la préparation est mise en présence de solution B contenant du NADP^+ (concentration finale = 5 mM), et incubée à la température ambiante.

En (A), la fraction altérée est mesurée en pourcentage de l'activité de la G6PD au temps considéré.

En (B), l'activité est mesurée en pourcentage de la G6PD avant la première incubation.

Notons qu'en valeur absolue, on constate également une diminution de cette fraction altérée (résultats non montrés).

Des résultats similaires sont obtenus lorsque l'on travaille sur un homogénat (non montrés).

Une étude par électrophorèse de la G6PD montre que la bande tétramérique de la G6PD qui avait pratiquement disparu après 24 heures d'incubation à pH 7,4, réapparaît de plus en plus nettement au cours de l'incubation en présence de NADP^+ (figure 19). La bande dimérique quant à elle, voit elle aussi augmenter l'intensité de sa coloration. Le NADP^+ semble donc, dans cette expérience, jouer plusieurs rôles : il permet une réactivation à 100 % de l'enzyme préalablement inactivé; il tend à faire disparaître l'altération apparue en même temps que la perte d'activité et il favorise la réapparition des formes dimériques et surtout tétramériques de la G6PD.

b) Etude de la réversibilité de l'altération chez les cellules vieilles

1. Par acidification du milieu d'incubation

Chez les cellules vieilles, la G6PD possède au départ, une fraction thermolabile qui représente 16 % de l'activité enzymatique. Nous nous sommes demandé si les conditions de réversibilité que nous avons mises au point dans le cas de l'altération de la G6PD induite in vitro chez les jeunes cellules, pouvaient être appliquées pour l'enzyme présent dans les cellules vieilles. Pour ce faire, nous avons incubé à 4°C un surnageant de ces cellules dans une solution à pH 6,5 et pH 7,4 (figure 20).

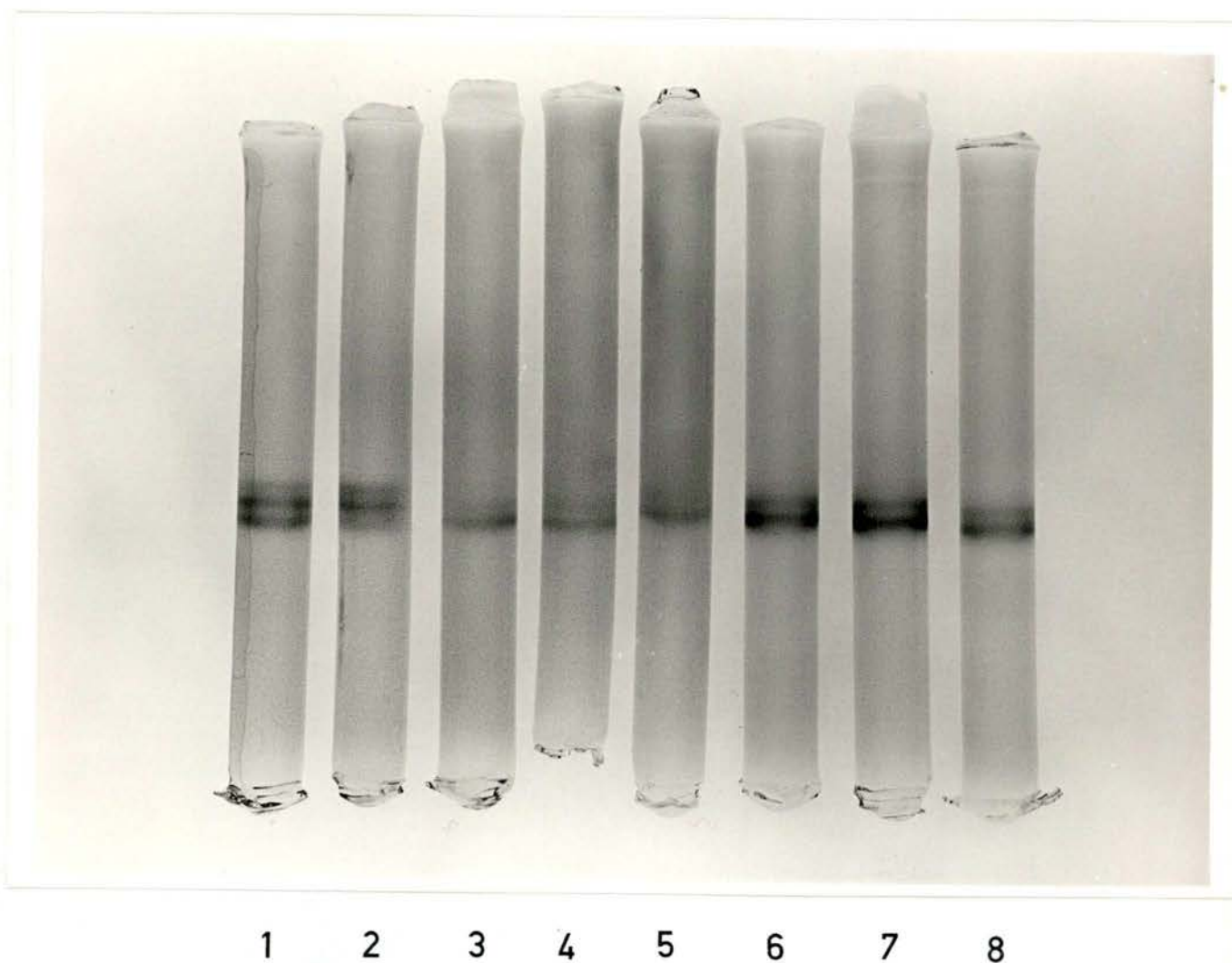


Figure 19.- Electrophorèses de la G6PD préincubée 24 heures à 4°C (3 et 4), puis incubée en présence de NADP^+ 5 mM durant 1/2 h. (5), 3 1/2 heures (6) et 8 heures (7 et 8). En 1 et 2, électrophorèse de la G6PD non incubée (contrôle).

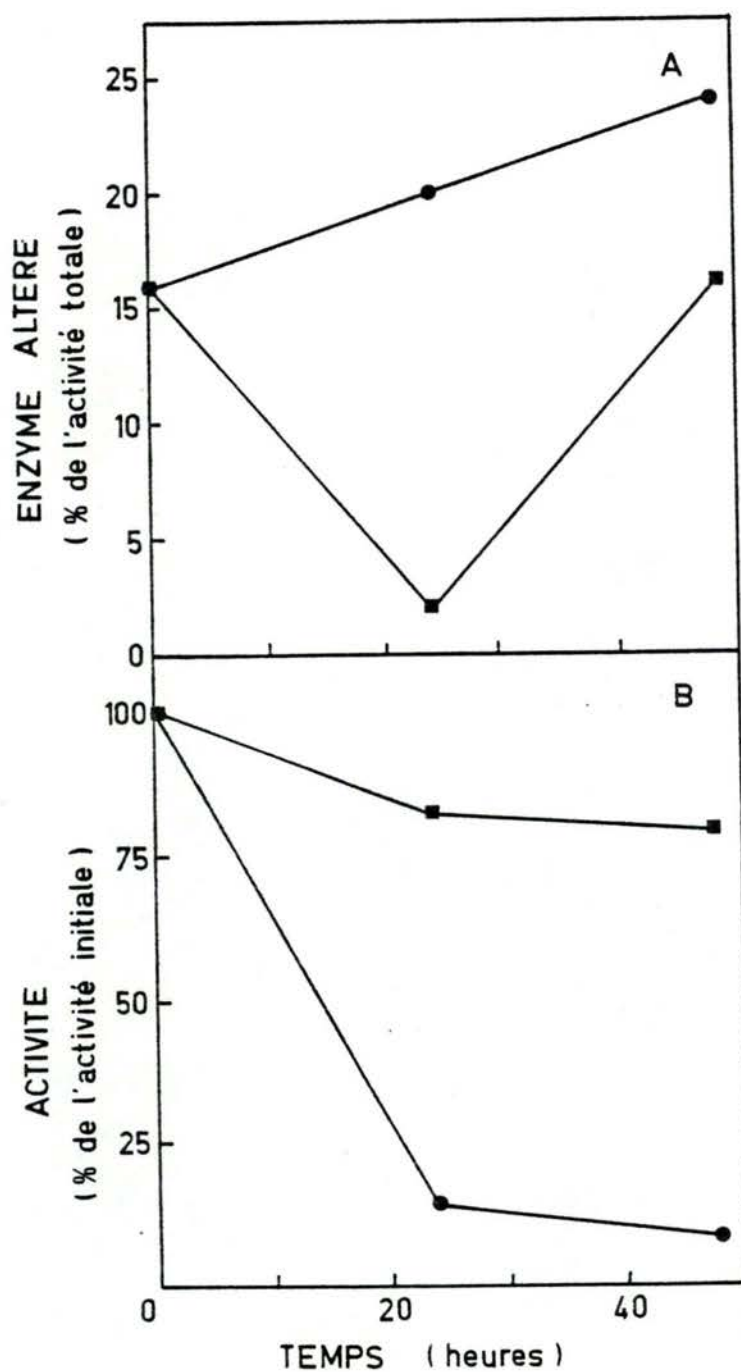


Figure 20.- Evolution en fonction du temps de la fraction thermolabile (A) et de l'activité (B) d'un surnageant de cellules vieilles lors de son incubation à 4°C dans une solution à pH 6,5 (■) et à pH 7,4 (●).
Les résultats sont exprimés comme dans la figure 13.

Lorsque le pH de la solution est de 7,4, l'on observe une inactivation importante de l'enzyme parallèlement à une augmentation de la forme altérée; par contre, lorsque le pH est de 6,5, l'inactivation est moins prononcée et l'altération diminue fortement après 24 heures avant de retrouver sa valeur de départ après 48 heures. Ces changements de comportement de la G6PD chez les vieilles cellules vont dans le même sens que ceux décrits sur les cellules jeunes à la figure 13. La forme thermolabile de 16 % au départ, augmente légèrement à pH 7,4 alors qu'elle passait de 0 % à environ 20 % chez les cellules jeunes. La protection de la forme altérée par le pH chez les cellules vieilles n'est que transitoire.

2. Par addition de NADP^+ dans le milieu d'incubation

Un surnageant de cellules vieilles présentant au départ 16 % de G6PD thermolabile fut incubé dans la solution A (pH 7,4) en présence de NADP^+ 5 mM.

L'évolution de la fraction thermolabile et de l'activité au cours du temps est présentée à la figure 21.

La présence du NADP^+ stabilise l'activité enzymatique pendant toute la durée de l'incubation. Cependant il faut attendre 48 heures d'incubation avant de voir une diminution de la quantité d'enzyme thermolabile.

3. Par modification du pH et addition de NADP^+ dans le milieu d'incubation

Les deux expériences précédentes nous montrent la difficulté d'obtenir une réversibilité totale de l'enzyme altéré chez les vieilles cellules. Nous avons donc incubé un surnageant de cellules vieilles dans les conditions les plus favorables pour obtenir cette réversibilité, c'est-à-dire

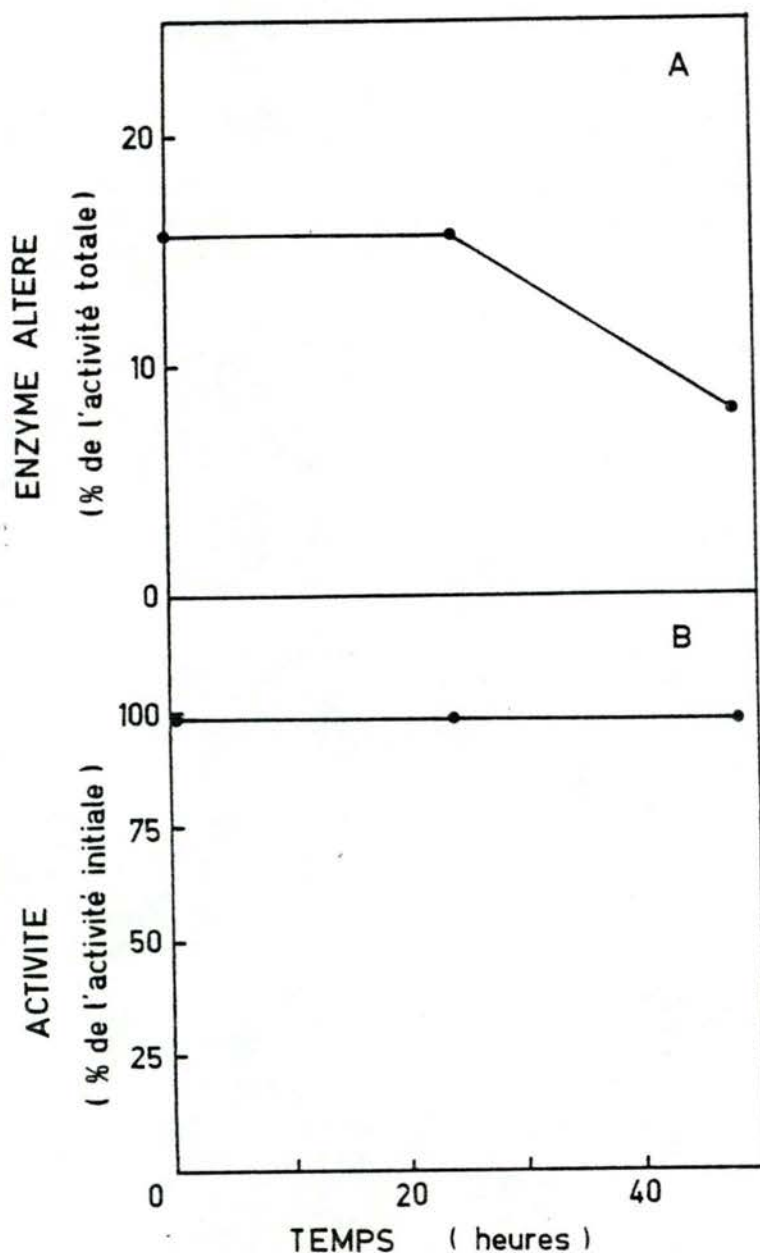


Figure 21.- Evolution en fonction du temps de la fraction thermo-labile (A) et de l'activité (B) d'un surnageant de cellules vieilles incubé à 4°C dans une solution à pH 7,4 en présence de NADP^+ 5 mM. Les résultats sont exprimés comme dans la figure 13.

à pH acide, en présence de NADP^+ et à une température plus élevée (Chung et Langdon, 1963). La fraction thermolabile de l'enzyme disparaît entièrement après une heure d'incubation dans ces conditions, mais réapparaît graduellement par la suite (figure 22). On constate donc que, mis dans des conditions favorables, l'enzyme thermolabile présent chez les vieilles cellules disparaît mais cette réversibilité est plus difficile à obtenir que sur l'enzyme de cellules jeunes préalablement altéré in vitro.

IV. MECANISME D'ALTERATION DE LA G6PD

Au cours des chapitres précédents, nous avons montré que l'altération de la G6PD chez les cellules jeunes était liée à l'inactivation et à la disparition des formes tétramériques de l'enzyme.

L'apparition de ces trois phénomènes dépend des conditions du milieu d'incubation. Un changement de l'environnement (pH, présence de NADP^+) peut faire disparaître les modifications apparues au niveau de l'enzyme qui retrouve ses propriétés initiales.

La G6PD peut se trouver sous trois formes moléculaires : les tétramères, les dimères et les monomères.

Bonsignore et al., (1971b) ont montré que la transformation d'une forme en une autre était favorisée par l'action de divers facteurs (pH, force ionique, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, cation⁺⁺).

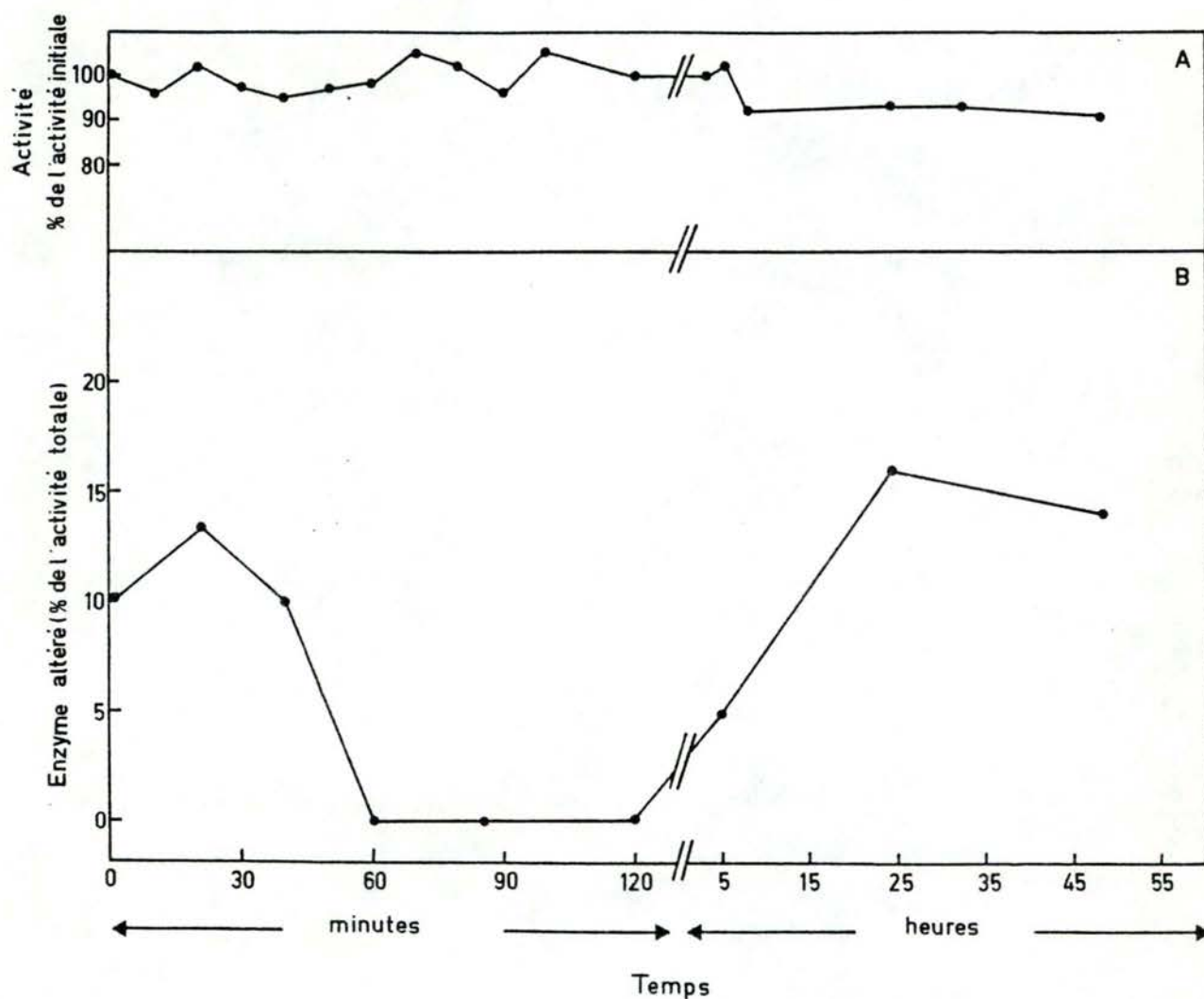


Figure 22.- Evolution en fonction du temps de l'activité (A) et de la fraction thermolabile (B) de la G6PD présente dans un surnageant de cellules vieilles lors de l'incubation à 20°C et à pH 6 en présence de 5 mM.

En A, l'activité est mesurée en pourcentage de l'activité de la G6PD avant l'incubation.

En B, la fraction thermolabile est mesurée en pourcentage de l'activité de la G6PD au temps considéré.

Nous avons tenté de séparer les différentes formes de la G6PD, par filtration sur gel Séphadex G-150 afin de tester si dans nos expériences, l'altération et l'inactivation de l'enzyme n'étaient pas liées à une modification des formes moléculaires de l'enzyme.

Nous avons complété ce travail en étudiant la cinétique de disparition et d'apparition de l'enzyme normal et de l'enzyme altéré et inactif.

a) Séparation des différentes formes moléculaires de la G6PD par filtration sur tamis moléculaire

Après plusieurs essais de gels différents, nous avons choisi pour la séparation des formes monomériques - dimériques et tétramériques de la G6PD la filtration sur une colonne de Séphadex G-150.

1. Etalonnage de la colonne et distribution des formes actives de la G6PD

Une colonne (1,4 x 50 cm) de Séphadex G-150 a été étalonnée avec des marqueurs dont les poids moléculaires étaient voisins des diverses formes de la G6PD : ce sont les IgG (PM = 160.000), l'albumine bovine (PM = 67.000), la peroxydase de type I (PM = 40.000) et le cytochrome c (PM = 12.400).

Le profil d'élution de ces molécules est montré à la figure 23. Le volume d'exclusion de la colonne fut estimé en mesurant le volume d'élution du bleu dextran (PM = 2.000.000). Le volume total de la colonne était de 77 ml. Les coefficients de partage de ces marqueurs ont été mis en relation avec le logarithme de leur poids moléculaire (figure 24).

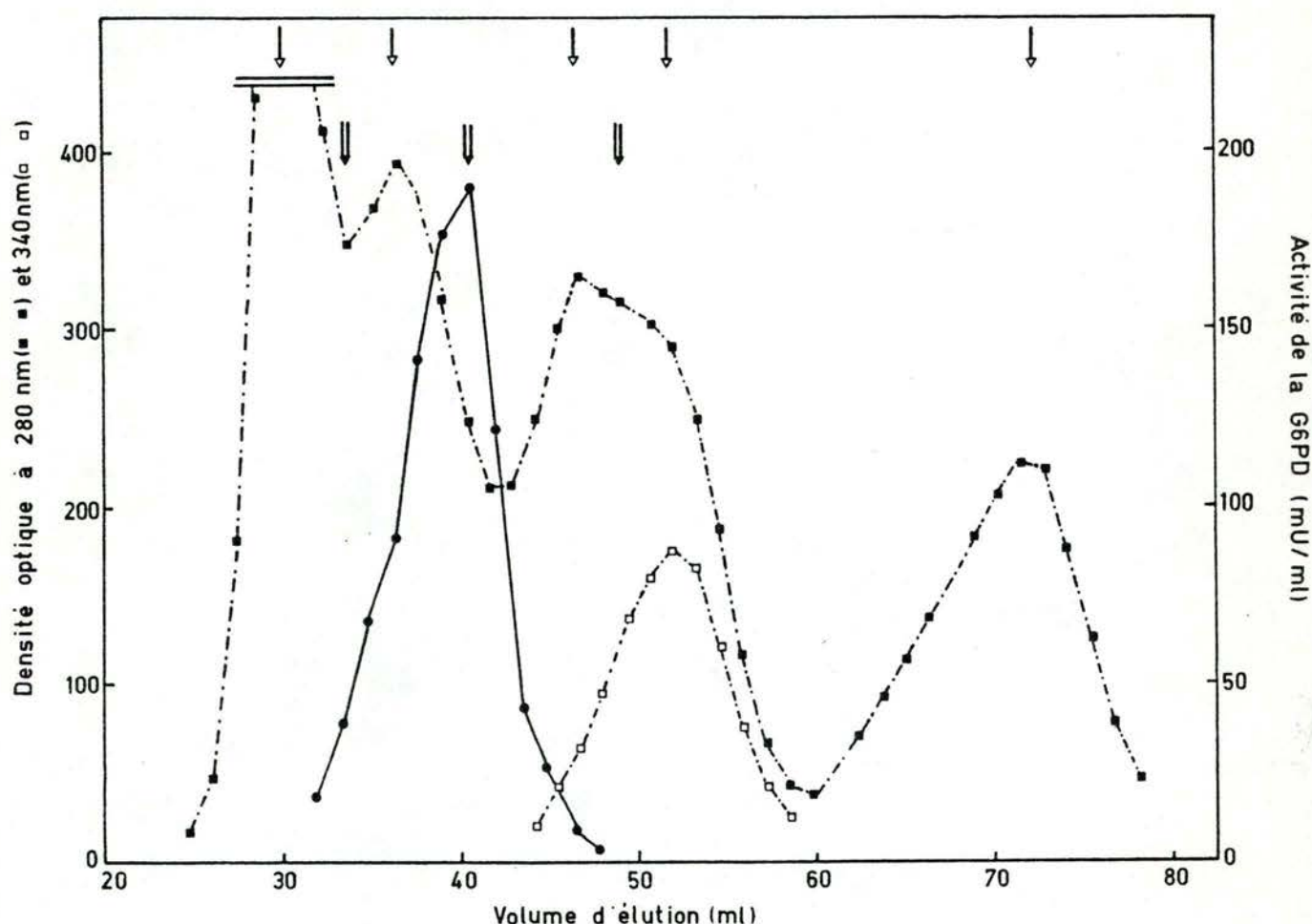


Figure 23.- Profil d'élution (trait discontinu) des différents marqueurs qui ont permis l'étalonnage de la colonne (1,4 x 50 cm) de Séphadex G-150.

La chromatographie est réalisée à 4°C dans du tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,4; le débit de la colonne est de 6 ml/h. et le volume des fractions de 1,2 ml.

Les flèches simples indiquent de gauche à droite, les pics d'élution du bleu dextran, des IgG, de l'albumine bovine, de la peroxydase de type I, du cytochrome c.

L'ordonnée de gauche exprime la densité optique à 280 nm (■---■) et à 410 nm (□---□) des fractions recueillies au cours de l'étalonnage; l'ordonnée de droite donne l'activité de la G6PD.

Le profil d'élution de la G6PD provenant d'un surnageant (14 mg de protéines) de cellules jeunes est représenté par un trait continu (●—●).

Les pics d'élution théoriques des tétramères, dimères et monomères calculés à partir de leur poids moléculaire, sont représentés de gauche à droite par des doubles flèches.

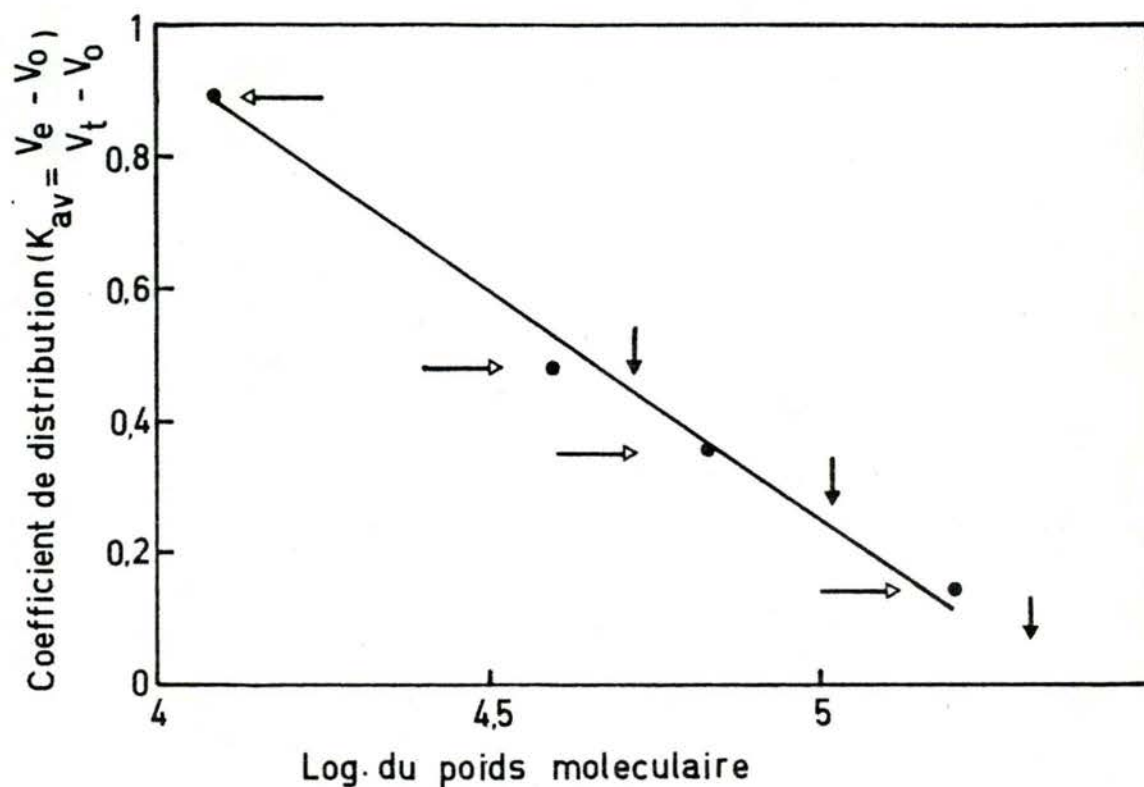


Figure 24.- Relation entre le logarithme du poids moléculaire et le coefficient de partage des protéines "marqueurs" filtrées sur gel de Séphadex G-150 (Andrews, 1965).

Les flèches horizontales représentent de gauche à droite : le cytochrome *c*, la peroxydase de type I, l'albumine bovine, les IgG.

Les flèches verticales représentent l'emplacement théorique sur la droite des tétramères, dimères et monomères, calculé à partir de leur poids moléculaire, respectivement de 210.000, 105.000 et 53.000.

V_o est le volume d'exclusion de la colonne,
 V_e le volume d'élution d'un soluté et
 V_t le volume total de la colonne de gel.

La droite obtenue (figure 24) nous a permis d'estimer les volumes d'élution des tétramères, dimères et monomères à partir de leur poids moléculaire (respectivement de 210.000 105.000 et 53.000 (Cohen et Rosemeyer, 1969, Rattazzi, 1968). Cette même colonne a alors été utilisée pour la chromatographie d'un surnageant de cellules jeunes (G 30). Le dosage de la G6PD a été réalisé sur les diverses fractions et son profil d'élution superposé à celui de la chromatographie de l'étalonnage (figure 23).

L'activité de la G6PD apparaît là où devaient se retrouver les dimères et les tétramères d'après la courbe d'étalonnage (figure 24).

Nous n'avons pas pu obtenir une bonne séparation de ces deux formes dont les pics d'activité montrent un épaulement.

Il apparaît cependant que les formes dimériques se retrouvent en plus grande quantité que les formes tétramériques. Les conditions lors de la filtration (pH 7,4, force ionique, absence de NADP^+) favoriseraient la transformation des tétramères en dimères (Bonsignore et al., 1971b).

Les monomères, s'ils sont présents, n'ont pu être mis en évidence par dosage de la G6PD puisqu'ils sont inactifs (Cohen et Rosemeyer (1969).

2. Mise en évidence des monomères par leur réactivation en présence de NADP^+

Pour étudier la répartition des formes altérées et inactives de la G6PD après filtration sur gel de Séphadex G-150, nous avons préincubé un homogénat de cellules jeunes à 4°C et pH 7,4 dans les conditions décrites précédemment. Après 24 heures, l'homogénat est centrifugé et le surnageant passé sur colonne.

Le dosage de la G6PD sur les fractions recueillies après filtration nous permet de mettre en évidence une activité de la G6PD là où l'on s'attend à retrouver les dimères et les tétramères (figure 25).

On remarque une faible activité de la G6PD à l'emplacement des monomères.

Les fractions obtenues après filtration furent alors incubées durant 24 heures à température ambiante en présence de NADP^+ 5 mM dans les conditions décrites au chapitre III a des Résultats .

Nous avons indiqué sur le graphique l'activité de la G6PD qui apparaît pendant cette incubation. La figure 25 indique clairement une forte activation de la G6PD dans les fractions dont le volume d'élution correspond à celui des monomères. L'activité retrouvée est considérablement plus élevée que celle due aux dimères et aux tétramères avant l'incubation.

L'analyse électrophorétique ne permet pas de mettre en évidence les monomères inactifs. Cependant lorsque ceux-ci sont réactivés, une bande apparaît au même niveau que les formes dimériques (figure 26).

Une certaine quantité de monomères se réactivent dans les fractions contenant principalement des dimères. Ceci s'observe en électrophorèse où la coloration de la bande dimérique

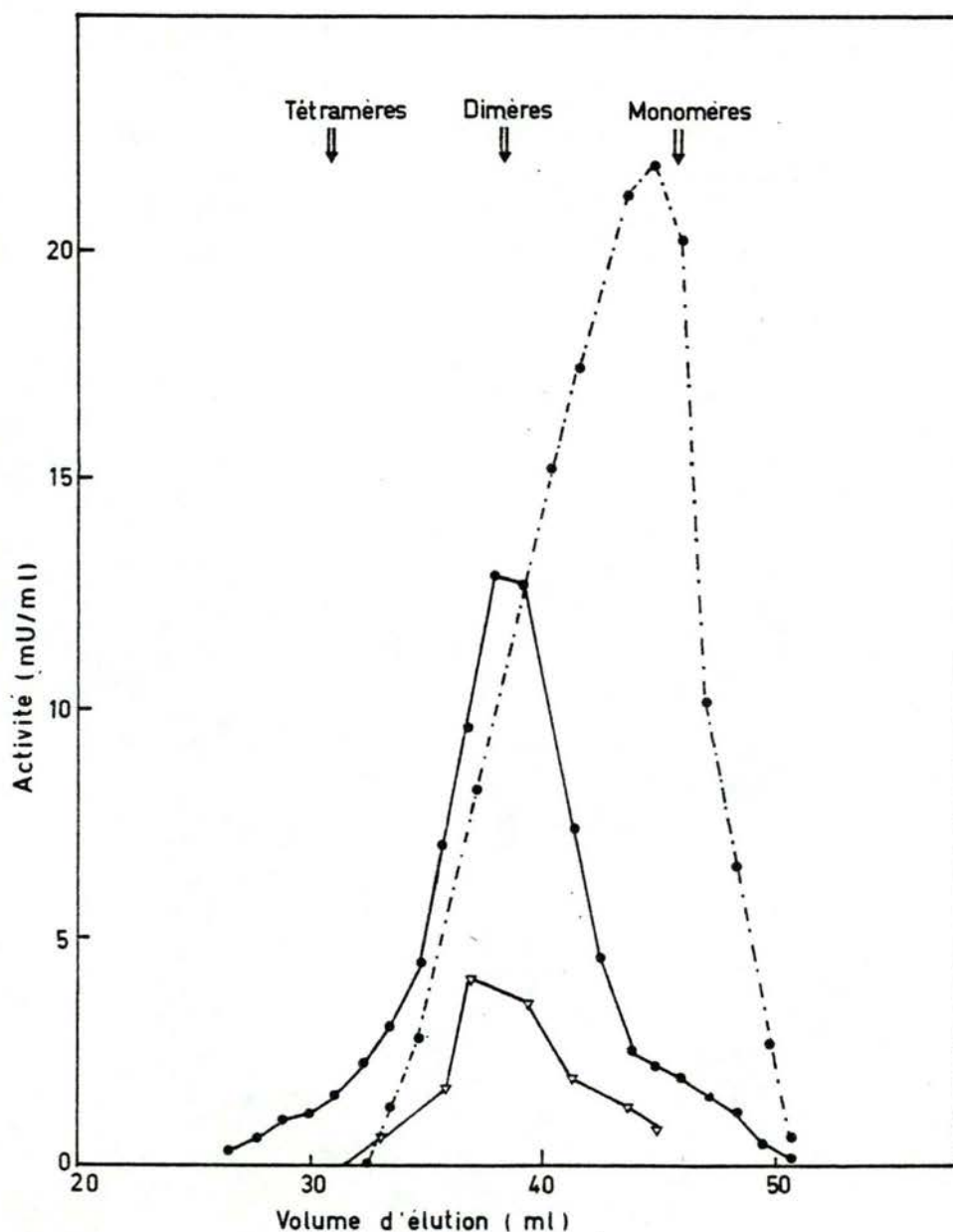


Figure 25.- Profil d'élution de la G6PD provenant d'un surnageant de cellules jeunes préalablement incubé 24 heures à 4°C et à pH 7,4.
 En trait continu : activité totale (●—●) et activité de l'enzyme thermolabile (▽—▽) mesurées sur les fractions recueillies de suite après filtration.
 En trait discontinu : activité de la G6PD réapparue après avoir incubé les fractions durant 24 heures à température ambiante en présence de NADP⁺ 5 mM.
 De gauche à droite, les doubles flèches représentent l'emplacement des tétramères, dimères et monomères calculé à partir des coefficients de partage (voir figure 24).

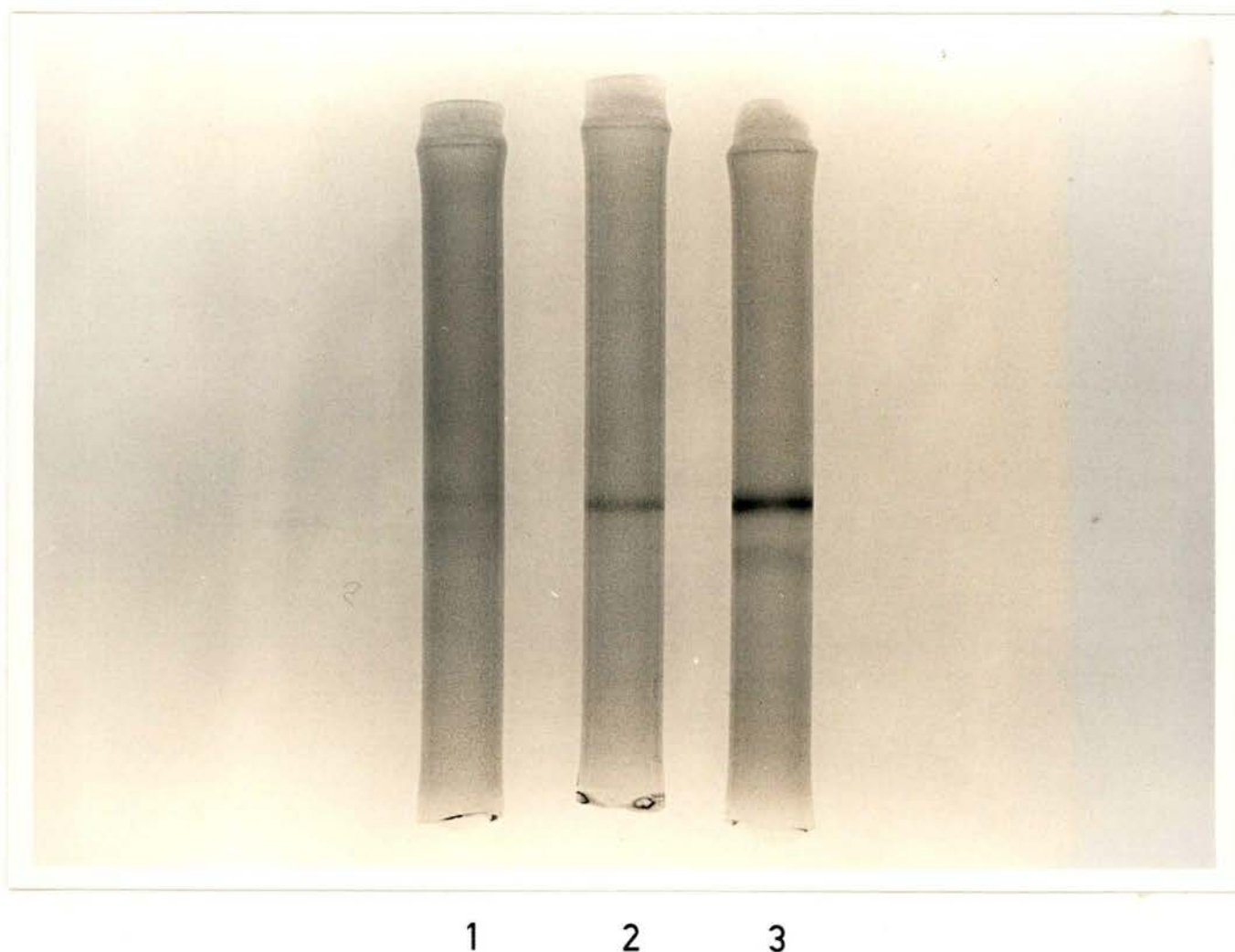


Figure 26.- Electrophorèses de la G6PD réalisées sur les fractions correspondant au pic d'élution des dimères (gel 1 et 2) et des monomères (gel 3). Les fractions étudiées en 2 et 3 ont été incubées 24 heures à température ambiante en présence de NADP^+ .

s'intensifie lorsque les fractions ont été incubées en présence de NADP^+ (figure 26).

L'inactivation de la G6PD lors des expériences réalisées précédemment sur les cellules jeunes, pourrait donc s'expliquer par le passage de l'enzyme sous forme de monomères inactifs. Ceux-ci selon les conditions du milieu d'incubation pourraient se réassocier en dimères actifs.

3. Répartition de l'enzyme altéré avant et après incubation en présence de NADP^+

Nous avons étudié le profil d'élution de la forme altérée de la G6PD (figure 25).

Pour chacune des fractions recueillies, nous avons réalisé les courbes d'inactivation à 59°C afin de déterminer pour chacune d'elles la quantité d'enzyme thermolabile. Le maximum d'enzyme thermolabile correspond au maximum d'activité des dimères. Au niveau de l'emplacement des tétramères, la quantité d'enzyme altéré diminue sensiblement et s'annule; par contre, une quantité significative se maintient à l'endroit où se situent les monomères. La présence d'enzyme altéré à cet endroit comme d'ailleurs d'activité enzymatique, peut s'expliquer par une réassociation partielle des monomères inactifs qui se serait produite entre le moment où les fractions sont recueillies et celui où les essais enzymatiques ont été effectués. Nous concluons donc que la forme thermolabile de la G6PD est composée de dimères.

Afin d'étudier le phénomène de réactivation de la G6PD altérée après 24 heures d'incubation, en présence de NADP^+ , nous avons réalisé les courbes de thermolabilité à 59°C de l'enzyme dans deux fractions : l'une contenait le pic d'activité des dimères et l'autre le pic d'activité des monomères.

La figure 27 montre que la G6PD de la fraction "dimérique" altérée à 20 % avant l'incubation en présence de NADP^+ , se comporte lors de son inactivation à 59°C , de la même façon qu'un enzyme normal : on ne peut plus détecter de fraction thermolabile après 24 heures.

Par contre, la G6PD de la fraction "monomérique" réactivée, contient encore 20 % d'enzyme thermolabile.

Le NADP^+ comme nous l'avons vu au chapitre III a des Résultats, favorise la disparition de la forme altérée. Nous avons pu montrer dans ce chapitre que celle-ci se trouvait sous forme dimérique.

Nous constatons d'autre part, une réactivation de la G6PD par réaggrégation des monomères en dimères en présence de NADP^+ . Dans nos conditions de travail, une partie de cet enzyme reformé se trouvait encore sous forme altérée.

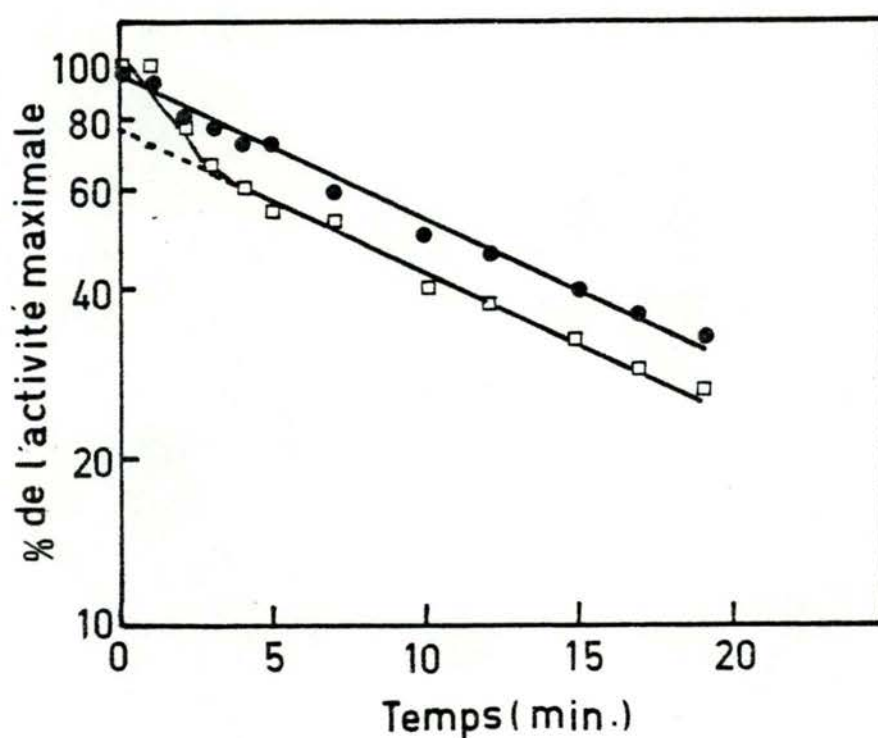


Figure 27.- Courbe d'inactivation à 59°C de la G6PD provenant de deux fractions recueillies après filtration sur gel de Séphadex G-150. Ces deux fractions furent préalablement incubées 24 heures à température ambiante en présence de NADP^+ 5 mM. La première (●) correspondait au pic d'activité des dimères, la seconde (□) au pic des monomères.

b) Altération et inactivation de la G6PD en tant
que réaction consécutive

Nous avons suivi l'évolution en fonction du temps, de la quantité d'enzyme actif, normal, altéré et inactif, lorsqu'on incube une suspension de cellules jeunes à 4°C et pH 7,4 dans les conditions décrites dans le chapitre Ia des Résultats.

La figure 28 montre que l'évolution de ces trois formes enzymatiques s'apparente à la cinétique d'une réaction consécutive. Cette réaction consécutive se traduit par une diminution constante de la forme active normale de l'enzyme, par une augmentation rapide de la forme intermédiaire qui précède l'apparition de la forme inactive et qui passe par un maximum avant de tendre vers une valeur nulle.

Dans ce cas, la forme normale se transforme progressivement en une forme altérée qui elle-même se transforme en forme inactive.

La forme thermolabile de la G6PD constituerait ainsi une étape intermédiaire avant l'inactivation de l'enzyme.

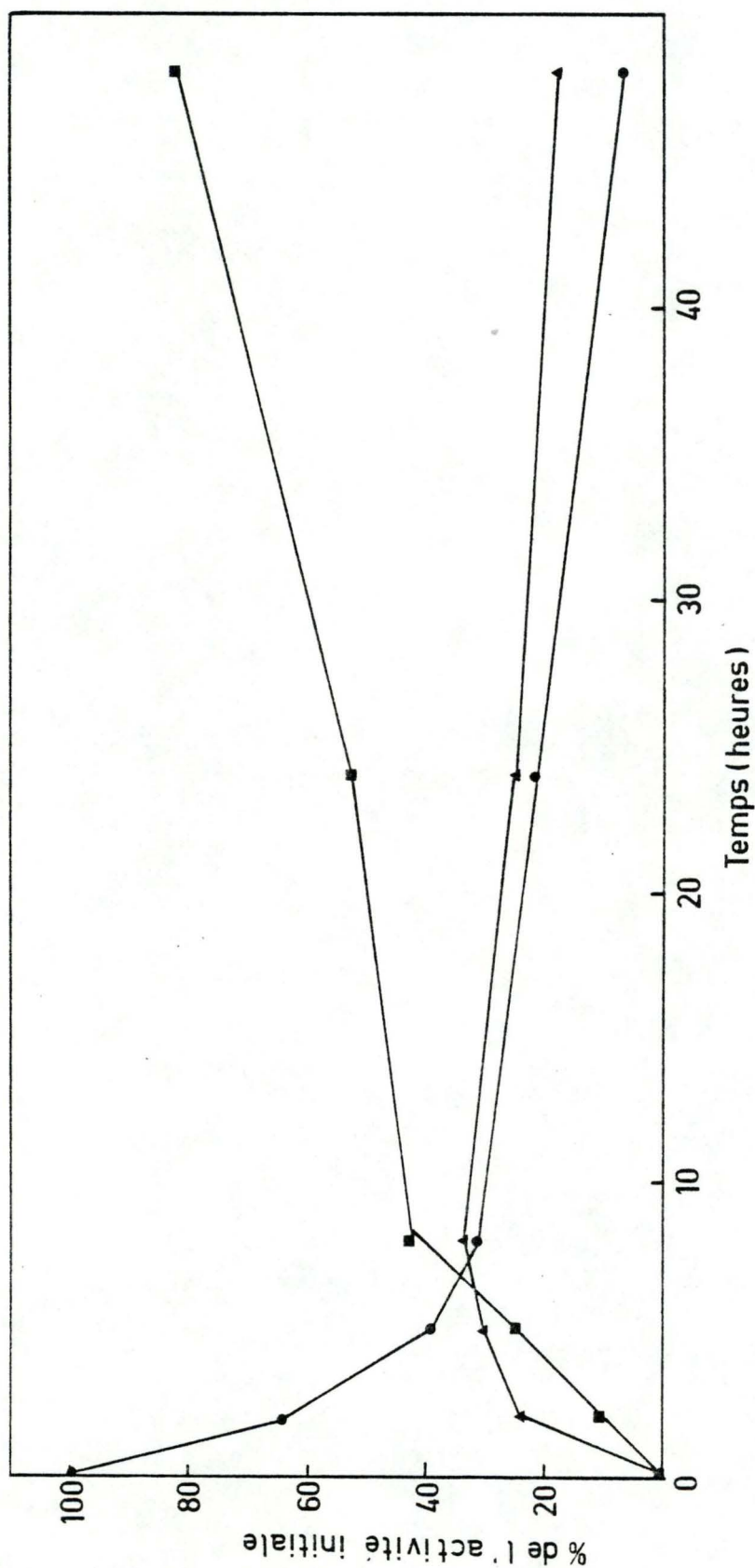


Figure 28.- Evolution au cours du temps (a) de la quantité d'enzyme normal (●) (b) de la forme altérée mesurée par le pourcentage de l'enzyme thermolabile (▲) et (c) de la quantité d'enzyme inactif mesurée par différence (■) lorsqu'une suspension de cellules jeunes est incubée à 4°C et pH 7,4 (voir Résultats chapitre Ia).

DISCUSSION

I. ABSENCE D'ALTERATION D'ENZYMES LYSOSOMIAUX ET MITOCHONDRIAUX EN TANT QU'ARGUMENT CONTRE LA THEORIE RESTRICTIVE DE L'ERREUR CATASTROPHIQUE

L'inactivation thermique est une méthode très sensible pour détecter une modification ou une hétérogénéité dans une population enzymatique. On a montré par exemple que parmi 56 variants de la G6PD de l'homme, 37 sont thermolabiles (Yoshida et al., 1971); de plus, parmi 52 mutants de la β -D-galactosidase, 32 ont une thermolabilité au moins deux fois supérieure à celle de la forme sauvage (Langridge, 1968).

Cette méthode nous a donc paru appropriée pour montrer une éventuelle modification des enzymes au cours du vieillissement.

Parmi les enzymes que nous avons testés, quatre enzymes montrent une courbe d'inactivation linéaire et peuvent donc être considérés comme homogènes. Ce sont : 1' α Glu, la NA β Glu, la NA α Gal, la sulfite cytochrome c réductase (figure 7).

La catalase possède une population hétérogène de molécules qui se différencient par leur thermolabilité et leurs propriétés électrophorétiques et chromatographiques (Mörikofer-Zwez et al., 1969 , Mainferme et Wattiaux, 1980, Scherz et al., 1976). Cette hétérogénéité, qui serait due à des modifications post-traductionnelles (Mainferme et Wattiaux, 1980, Mörikofer-Zwez et al., 1969) explique chez les cellules WI-38 le comportement également hétérogène de la catalase lors de son inactivation à haute température.

La comparaison de la thermolabilité des enzymes mitochondriaux et lysosomiaux de cellules jeunes et de cellules

vieilles ne révèle aucune différence significative dans les courbes d'inactivation.

Celles-ci sont caractéristiques de populations enzymatiques qui restent homogènes au cours du vieillissement.

L'étude de la thermolabilité des différents enzymes a été réalisée aux pH pour lesquels leur activité est optimale. Une objection à nos résultats est que le pH choisi masque une altération qui pourrait être révélée à un autre pH.

Pour répondre à cette objection, nous avons réalisé une courbe de thermolabilité de l' α Glu à pH 7,4 au lieu de 4,5 (résultats non montrés).

A ce pH, l'enzyme est nettement moins stable; la température d'inactivation a donc dû être abaissée à 47°C (au lieu de 63°C à pH 4,5) afin que la perte d'activité soit d'environ 50 % après 30 minutes d'incubation. Les courbes d'inactivation de l' α Glu réalisées dans ces conditions n'ont révélé aucune différence entre les cellules vieilles et les cellules jeunes. Ce résultat montre que le pH utilisé pour l'étude de la thermolabilité n'influence pas la mise en évidence d'une altération de l' α Glu au cours du vieillissement.

On peut supposer qu'il en est de même pour les autres enzymes étudiés.

La catalase, vu son hétérogénéité, présente déjà chez les cellules jeunes, une fraction thermolabile qui représente 30 % de l'activité enzymatique totale. Cependant la quantité d'enzyme thermolabile n'augmente pas chez les cellules vieilles et, en fait, est strictement identique à celle observée chez les cellules jeunes.

Ces résultats, bien que suggérant un comportement identique de la catalase dans les deux types de cellules, doivent cependant

être considérés avec réserve lorsqu'il s'agit de conclure à l'absence d'altération chez les vieilles cellules. Il est en effet plus difficile de détecter une faible quantité d'enzyme thermolabile lorsque la population enzymatique est déjà hétérogène au départ (Holliday et Tarrant, 1972).

D'autre part, les tests ont été réalisés sur des homogénats de cellules; or, Mainferme et Wattiaux (1980) ont montré que la catalase peut être attaquée par des enzymes protéolytiques qui la modifient, cette digestion partielle pourrait ainsi masquer l'apparition d'une fraction thermolabile due au vieillissement proprement dit.

N'ayant pas de point de comparaison pour les cellules WS-HMG, nous n'avons pas cru bon de développer l'étude de la catalase sur ces cellules.

Les courbes de thermolabilité de l' α Glu, de la NAGlu, de la NAGal, de la sulfite cytochrome c réductase ont été réalisées sur les fibroblastes WS-HMG (figure 8).

Rappelons que ces cellules proviennent de la peau d'un individu atteint du syndrome de Werner (maladie caractérisée par un vieillissement prématuré).

Les courbes d'inactivation de ces enzymes ne révèlent aucune fraction thermolabile pour les enzymes mitochondriaux et lysosomiaux étudiés.

Nous observons donc un comportement identique de ces enzymes chez les cellules WI-38 vieilles et jeunes et chez les cellules WS-HMG.

Les résultats discutés précédemment contrastent avec ceux obtenus pour la G6PD (enzyme cytoplasmique).

En effet, chez les cellules WI-38 vieilles et chez les cellules WS-HMG, 20 à 25 % de l'activité enzymatique est associée à une fraction thermolabile.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus précédemment sur les cellules MRC5 (Holliday et Tarrant, 1972), sur différents tissus de vieilles souris (Wulf et Cutler, 1975), sur les cellules provenant d'individus atteints du syndrome de Werner (Holliday et al., 1974, Goldstein et Moerman, 1975b).

La présence d'enzyme altéré dans les cellules vieilles et dans les cellules de "Werner" a été utilisée comme argument en faveur de la théorie de l'erreur catastrophique émise par Orgel (1963).

Cette théorie explique le vieillissement par l'accumulation au hasard, d'erreurs dans la synthèse de protéines. Celles-ci, comme nous le montre la figure 29, provoqueraient une déficience de la machinerie synthétique qui, lorsqu'elle dépasserait un seuil critique, serait létale pour la cellule.

Cette hypothèse suggère donc que les enzymes synthétisés par cette machinerie déficiente, constitueraient une population hétérogène composée de molécules normales et altérées. Ces dernières pourraient être complètement ou partiellement actives, ou totalement inactives.

Nous avons montré cependant que chez les cellules WI-38 et chez les cellules WS-HMG, quatre enzymes au moins ne semblent pas significativement modifiés durant le processus de vieillissement.

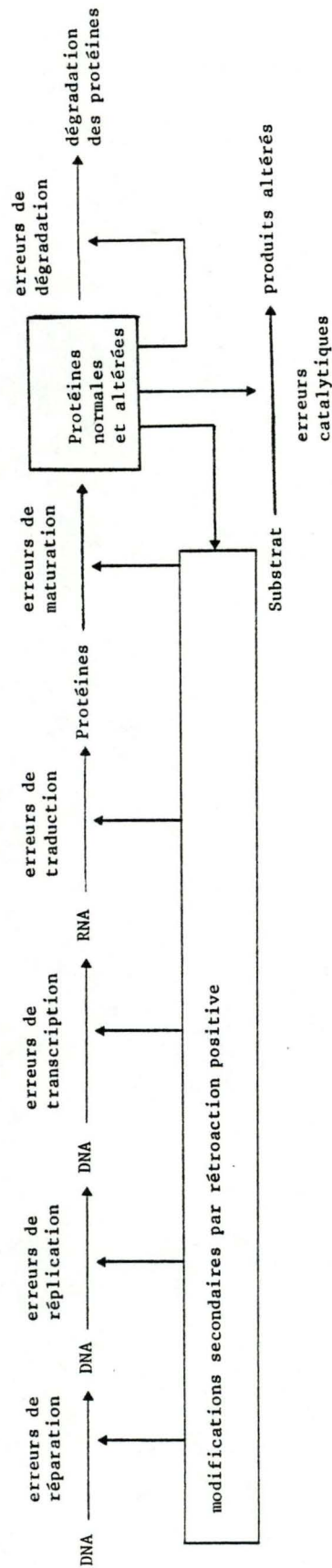


Figure 29.- Processus d'apparition de protéines altérées au cours du vieillissement, selon la théorie de l'erreur catastrophique d'Orgel (d'après Wulf et Cutler, 1975).

Il est possible que les modifications présentes ne soient pas détectables, ce qui serait le cas si toutes les molécules altérées étaient inactives, si ces modifications ne changeaient pas la stabilité thermique de l'enzyme et enfin, si le pourcentage d'altération était inférieur à 5 % (limite de la méthode utilisée).

Les deux premières éventualités si elles existent, ne rentrent pas dans le cadre de la théorie d'Orgel : en effet l'incorporation erronée d'acides aminés devrait produire une hétérogénéité considérable dans la structure des enzymes et donc dans leur stabilité thermique et leur activité enzymatique (Langridge, 1968).

D'autre part, une fraction thermolabile inférieure à 5 % aurait pu apparaître chez les cellules vieilles pour l'un ou l'autre enzyme étudié sans avoir pu être mise en évidence.

Il serait cependant étonnant que ce soit le cas pour les cinq enzymes étudiés alors que nous verrons un peu plus loin que sur 17 enzymes cytoplasmiques recensés dans la littérature, plus de la moitié montre une altération détectable par l'étude de la thermolabilité.

La théorie de l'erreur catastrophique est d'ailleurs très controversée et des arguments ont été avancés aussi bien pour la défendre que pour la mettre en doute (Baird et al., 1975, Holliday, 1975, Klefenz, 1978, Gershon et Gershon, 1976, Gershon, 1979, Rothstein, 1975, Rothstein, 1977, Rothstein, 1979, Dreyfus et al., 1977, Dreyfus et al., 1978).

La présence d'enzymes altérés et inactifs dans les organismes vieux a longtemps été considérée comme une preuve en faveur de cette théorie.

Cependant, nous venons de montrer que tous les enzymes ne sont pas modifiés, comme on pourrait le prédire si une déficience apparaissait dans le mécanisme de synthèse. De plus, les modifications ne sont pas toujours reproductibles et ne semblent pas apparaître au hasard (apparition préférentielle d'altération dans le cytoplasme et absence d'altération des enzymes mitochondriaux et lysosomiaux).

De plus, nous avons montré dans nos résultats que la courbe d'inactivation de la G6PD chez les vieilles cellules se comporte comme la somme de deux exponentielles décroissantes ce qui signifie que l'enzyme est composé de deux populations d'enzymes homogènes, l'une contenant un enzyme plus thermolabile que l'autre. Ce comportement homogène de l'enzyme altéré s'oppose à la théorie d'Orgel qui voudrait que les modifications soient introduites au hasard et donc conduisent à la formation d'une population d'enzymes très hétérogène; il serait improbable que tous ces enzymes altérés se comportent de manière identique du point de vue de leur thermolabilité.

Un postulat de la théorie d'Orgel suppose que l'introduction d'erreurs au niveau de la transcription ou de la traduction induit une modification des protéines et un vieillissement prématuré.

Holliday et Tarrant (1972) ont obtenu une réduction du nombre de divisions des cellules MRC5 et une altération de la G6PD après incorporation d'une base analogue, le 5-fluoro-uracil.

Cependant, d'autres auteurs n'ont pu mettre en évidence un tel effet après incubation de ces fibroblastes en présence de concentrations non toxiques de deux analogues d'acides aminés : la parafluorophénylalanine et l'éthionine (Ryan et al., 1974, et Duncan et Dell'Orco, 1979).

L'absence de modifications des protéines virales synthétisées par des cellules vieilles s'oppose également à la théorie de l'erreur catastrophique (Holland et al., 1973, Tomkins et al., 1974). Ces résultats sont en effet incompatibles avec l'hypothèse d'une machinerie synthétique déficiente.

Ajoutons que de nombreuses modifications de protéines apparaissent également dans des systèmes où aucune synthèse ne se passe, c'est le cas par exemple, pour les globules rouges humains (Dreyfus et al., 1978).

Toutes ces observations plaident en faveur de modifications posttraductionnelles des enzymes plutôt qu'en faveur d'erreurs dans le mécanisme de synthèse protéique.

II. LES ALTERATIONS ENZYMATIQUES ET LEURS INTERPRETATIONS

a) Revue des enzymes altérés au cours du vieillissement

Les enzymes que nous avons étudiés sont spécifiques de certains compartiments cellulaires : lysosomes, mitochondries, peroxysomes et cytoplasme.

A l'opposé de la G6PD, enzyme du cytoplasme, aucune fraction thermolabile ne semble apparaître au niveau des cinq enzymes situés dans les trois autres compartiments cellulaires.

Il était dès lors intéressant afin de connaître la portée de ces observations, de comparer nos résultats avec ceux obtenus par d'autres laboratoires sur différents enzymes en spécifiant leur appartenance à tel ou tel compartiment cellulaire.

L'étude détaillée de la G6PD sera réalisée séparément.

De nombreuses caractéristiques enzymatiques ont été étudiées au cours du vieillissement; il s'agit entre autres du pH optimum d'activité, de l'affinité pour le substrat (K_m), de l'affinité pour les inhibiteurs spécifiques (K_i), de la mobilité électrophorétique, de la composition en acides aminés, du poids moléculaire, etc... (Goren et al., 1977, Reiss et Rothstein, 1975, Gershon et Gershon, 1973b, Gupta et Rothstein, 1976a, Gupta et Rothstein, 1976b, Reiss et Gershon, 1976a, Sharma et al., 1976).

Ces propriétés ne semblent pas modifiées au cours du vieillissement à quelques exceptions près (Mennecier et Dreyfus, 1974, Sharma et al., 1976, Gupta et Rothstein, 1976b).

Cependant, les modifications apparaissent au niveau de l'activité spécifique, de la thermolabilité et dans certains cas,

"un matériel à réaction croisée" (CRM) a pu être mis en évidence.

Il s'agit de mettre en évidence des molécules devenues inactives mais qui sont néanmoins capables de réagir avec les anticorps formés contre l'enzyme. Cette méthode permet donc de détecter la présence de molécules qui ont perdu partiellement ou totalement leur activité catalytique tout en conservant leur activité antigénique.

Nous avons repris dans la table IV, les résultats obtenus pour divers enzymes testés chez plusieurs espèces (homme, souris, rat, Turbatrix aceti ...).

L'évolution de l'activité spécifique a été déterminée pour un grand nombre d'enzymes au cours du vieillissement. Nous ne reprenons dans cette table que les enzymes pour lesquels une des deux propriétés citées (thermolabilité ou CRM) a été en plus étudiée.

Pour une espèce donnée, les recherches ont été effectuées sur différents systèmes tels que des cultures de cellules ou des extraits provenant de tissus aussi différents que le foie, la peau, le poumon ...

Nous avons été surpris de constater que parmi les 21 enzymes ainsi recensés dans la littérature, 16 appartiennent au compartiment cytoplasmique et 8 interviennent directement dans la glycolyse.

La plupart des enzymes cytoplasmiques montrent au cours du vieillissement la variation d'au moins un des trois facteurs repris dans la table.

Table IV.- Revue des enzymes altérés au cours du vieillissement dans les différents compartiments subcellulaires

ENZYME	ESPECE	ORIGINE	PREPARATION	MODIFICATIONS			COMPARTIMENT CELLULAIRE	REFERENCES
				Activité spécifique	Thermolabilité	C.R.M.		
Fructose 1-6 diphosphate aldolase	<u>Turbatrix aceti</u>	Organisme entier	Homogénat	-	0	+	Cytoplasme (glycolyse)	Zeelon et al. (1973)
	<u>Turbatrix aceti</u>	Organisme entier	Enzyme purifié	-	-	+	"	Reznick et Gershon (1977)
Aldolase A	Souris	Tissu musculaire	Homogénat	(-)	+	+	Cytoplasme (glycolyse)	Gershon et Gershon (1973a)
Aldolase A	Homme	Tissu musculaire	Extrait cellulaire	-	+	+	"	Steinhagen-Thiessen et Hilz (1976)
Aldolase A	Homme	Lymphocytes	Extrait cellulaire	0	0	0	"	Steinhagen-Thiessen et Hilz (1979)
Aldolase B	Souris	Foie	Homogénat	-	+	+	"	Gershon et Gershon (1973b)
	Souris	Foie	Extrait cellulaire		0	0	"	Burrows et Davison (1980)
Aldolase B	Rat	Foie	Extrait cellulaire	0	0	0	"	Weber et al. (1976)
	Chien	Foie	Extrait cellulaire		0	0	"	Burrows et Davison (1980)
Créatine kinase	Homme	Tissu musculaire	Surnageant	-	0	0	Cytoplasme	Steinhagen-Thiessen et Hilz (1976)
Enolase	<u>Turbatrix aceti</u>	Organisme entier	Enzyme purifié	-	+	+	Cytoplasme (glycolyse)	Sharma et al. (1976)
Glucose phosphate isomérase	Homme	Culture de cellules de foie d'adulte	Extrait cellulaire	0		0	Cytoplasme (glycolyse)	Kahn et al. (1977b)
	Homme	Culture de fibroblastes de poumon foetal (MRC5)	Extrait cellulaire	0	0	0	"	Shakespeare et Buchanan (1978)
Glutamine synthétase	Homme	Culture de fibroblastes de poumon foetal (WI-38)	Homogénat et surnageant	-	-	-	Cytoplasme (biosynthèse des a.a.)	Viceps-Madore et Cristofalo (1978)
Glutathion réductase	Homme	Cristallin	Extrait cellulaire		+	+	Cytoplasme	Harding (1973)
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase	Homme	Culture de fibroblastes de peau d'adulte	Extrait cellulaire (surnageant)		+	+	Cytoplasme (métabolisme de la purine)	Goldstein et Moerman (1975b)
Lactate déshydrogénase	Homme	Culture de fibroblastes de poumon foetal (MRC5)	Homogénat	-	+	+	Cytoplasme (glycolyse, synthèse du glycogène)	Lewis et Tarrant (1972)
	Rat	Foie	Extrait cellulaire	-	+	+	"	Schapira et al. (1975)
	Souris	Muscle	Extrait cellulaire (surnageant)	-	0	0	"	Oliveira et Pfuderer (1973)
6-Phosphogluconate déshydrogénase	Homme	Culture de fibroblastes de poumon foetal (MRC5)	Extrait cellulaire (surnageant)		+	+	Cytoplasme (chaîne des pentoses-phosphate)	Holliday et Tarrant (1972)
	Homme	Culture de fibroblastes de peau d'adulte	Extrait cellulaire (surnageant)		+	+	"	Goldstein et Moerman (1975b)
3-Phosphoglycérate kinase	Homme	Culture de cellules de foie d'adulte	Extrait cellulaire (surnageant)	0		0	Cytoplasme (glycolyse)	Kahn et al. (1977b)
	Homme	Cristallin	Extrait cellulaire (surnageant)		0	0	"	Harding (1973)
	<u>Turbatrix aceti</u>	Organisme entier	Enzyme purifié	-	0	0	"	Gupta et Rothstein (1976b)
Phosphorylase	Souris	Coeur	Extrait cellulaire (surnageant)	0	-	-	Cytoplasme (entrée des glucides dans la glycolyse, dégradation du glycogène)	Capasso et Zimmerman (1980)
Pyruvate kinase	Homme	Culture de cellules de foie d'adulte	Extrait cellulaire	0		0	Cytoplasme (glycolyse, biosynthèse des glucides)	Kahn et al. (1977b)
Superoxyde dismutase	Chien	Foie	Extrait cellulaire		+	0	Cytoplasme	Burrows et Davison (1980)
	Rat	Foie	Enzyme purifié	-	+	+	Cytoplasme	Reiss et Gershon (1976a)
		Foie	Homogénat	(-)	+	+	Cytoplasme	Reiss et Gershon (1976b)
		Coeur	Homogénat	0	+	+	Cytoplasme	"
		Cerveau	Homogénat	0	+	+	Cytoplasme	"
	Souris	Foie	Homogénat	(-)	+	+	"	"
		Coeur	"	0	+	+	"	"
		Cerveau	"	0	+	+	"	"
		Foie	Extrait cellulaire		0	0	"	Burrows et Davison (1980)
	Homme	Fibroblastes de poumon foetal (WI-38)	Extrait cellulaire (surnageant)	+	+	+	Cytoplasme	Somville et Remacle (1980)
Triose phosphate isomérase	<u>Turbatrix aceti</u>	Organisme entier	Homogénat	-	0	0	Cytoplasme (glycolyse)	Gupta et Rothstein (1976a)
			Enzyme purifié	0	0	0	"	"
Isocitrate lyase	<u>Turbatrix aceti</u>	Organisme entier	Extrait cellulaire	-	+	+	Glyoxysome	Gershon et Gershon (1970)
	<u>Turbatrix aceti</u>	"	Enzyme purifié	-	+	+	Glyoxysome	Reiss et Rothstein (1974)
Glucose-6-phosphatase	Rat	Foie	Fraction microsomiale		+	+	Réticulum endoplasmique	Grinna et Barber (1975)
		Rein	"		-	-	"	"
Superoxyde dismutase	Homme	Culture de fibroblastes de poumon foetal (WI-38)	Fraction mitochondriale	+	0	0	Mitochondries	Somville et Remacle (1980)
β -D-Galactosidase	Homme	Culture de cellules de foie	Extrait cellulaire	-		0	Lysosomes	Leray et al. (1981)
β -Glucuronidase	Homme	Granulocytes	Extrait cellulaire (surnageant)	0		0	Lysosomes	Rubinson et al. (1976)
α -Mannosidase	Homme	Granulocytes	Extrait cellulaire (surnageant)	0		0	Lysosomes	Rubinson et al. (1976)

* Les modifications considérées sont les variations dans les activités spécifiques (A.S.), dans la thermolabilité (T) et la mise en évidence d'un matériel à réaction croisée (C.R.M.)

La thermolabilité a été étudiée pour 12 enzymes cytoplasmiques; une modification apparaît pour 8 de ces enzymes dans au moins un des systèmes de vieillissement considérés.

Dans le même ordre d'idée, 5 enzymes sur 10 montrent la présence d'un CRM et 9 enzymes sur 12 voient leur activité spécifique diminuer.

Pour chacune des caractéristiques considérées, la majorité des enzymes sont donc modifiées.

Remarquons de nouveau que la thermolabilité semble une méthode adéquate pour détecter la présence d'enzyme altérée puisque 8 enzymes sur les 12 montrent une variation de cette propriété.

Nous avons considéré ci-dessus qu'un enzyme était modifié dès qu'un changement survenait ne fut-ce que dans un seul des systèmes étudiés.

En fait, les modifications qui apparaissent ne sont pas toujours reproductibles d'une espèce, d'un tissu, d'une culture, d'une préparation à l'autre.

Les cas de l'aldolase et de la G6PD (qui sera étudiée plus loin) sont significatifs. Les modifications des propriétés de l'aldolase au cours du vieillissement sont différents selon l'espèce (ex. la souris et le rat) selon le tissu (lymphocytes et muscle de l'homme) selon la préparation (homogénat ou enzyme purifié à partir de T.aceti)... Des variations semblables apparaissent également pour d'autres enzymes tels que la lactate déshydrogénase, la 3-phosphoglycerate kïnase et la superoxyde dismutase.

De nombreux facteurs peuvent influencer et expliquer ces résultats contradictoires, tels que la capacité de division des cellules et leur différenciation, le régime de

température, les conditions sanitaires, l'âge des organismes, les méthodes de préparation utilisées, etc...

Soulignons que, à l'intérieur d'un même système de travail, les conclusions sont identiques : le CRM, l'activité spécifique et la thermolabilité sont modifiés chez la plupart des enzymes.

Deux enzymes cytoplasmiques ne semblent pas modifiés au cours du vieillissement : ce sont la pyruvate kinase et la glucose-phosphate isomérase.

Très peu de recherches ont été réalisées sur des enzymes appartenant à d'autres compartiments cellulaires. Nous avons relevé l'isocitrate lyase située dans les glyoxysomes et la glucose-6-phosphatase se trouvant au niveau du réticulum endoplasmique.

Ces enzymes n'ont été étudiées que dans une espèce (respectivement Turbatrix aceti et le rat).

L'isocitrate lyase voit son activité spécifique, sa thermolabilité et son CRM varier chez les organismes vieux.

L'évolution de la thermolabilité de la glucose-6-phosphatase est contradictoire : une fraction thermolabile apparaît dans le foie mais pas dans le rein.

La superoxyde dismutase mitochondriale a été étudiée dans notre laboratoire (Somville et Remacle, 1980). Cet enzyme ne montre pas de modification de sa thermolabilité chez les cellules WI-38 vieilles; elle voit cependant son activité spécifique augmenter.

En ce qui concerne les trois enzymes lysosomiaux étudiés la β -D-galactosidase, la β -glucuronidase, l' α -mannosidase, les essais de mise en évidence de CRM se sont révélés négatifs.

Plusieurs conclusions peuvent être tirées.

1. La majorité des enzymes dont les propriétés qualitatives ont été étudiées au cours du vieillissement, appartiennent au compartiment cytoplasmique.

Dans notre recherche bibliographique, nous n'avons trouvé aucun travail dans ce domaine, se rapportant aux enzymes mitochondriaux et peroxysomiaux.

Quant aux enzymes lysosomiaux, aucune modification ne semble apparaître au cours du vieillissement.

2. Bien qu'il serait nécessaire de tester un plus grand nombre d'enzymes, nos résultats suggèrent fortement que l'apparition des modifications pourrait être liée à un compartiment cellulaire particulier et ne surviendrait donc pas au hasard.

Nous avons vu en effet que la grande majorité des enzymes cytoplasmiques étaient modifiées au cours du vieillissement. Par contre, nous n'avons pu montrer la présence de fraction thermolabile pour les enzymes mitochondriaux et lysosomiaux des cellules WI-38 vieilles et des cellules WS-HMG.

L'absence d'altération des enzymes étudiés, de même que la ségrégation des modifications dans certains compartiments cellulaires sont incompatibles avec la théorie d'Orgel. Par contre, ces changements s'expliquent facilement dans l'hypothèse de modifications posttraductionnelles.

b) Modifications de la G6PD au cours du vieillissement

La G6PD a été étudiée dans plusieurs systèmes au cours du vieillissement. Les résultats obtenus sont contradictoires. Chez l'homme, la présence d'une fraction thermolabile de la G6PD fut mise en évidence dans des cultures de fibroblastes provenant de poumon d'un embryon (Holliday et Tarrant, 1972, Houben et Remacle, 1978), de la peau d'un nouveau né (Duncan et al., 1977) et d'individus atteints du syndrome de Werner et de progerie (Holliday et al., 1974, Houben et al., 1980, Goldstein et Singal, 1974, Goldstein et Moerman, 1975a).

Pendergrass et al. (1976) ont utilisé le même type de cellules que Duncan et al. (1977) et n'ont pu obtenir d'altération de la G6PD.

Kahn et al., (1977a et 1977b) ont mis en évidence une fraction thermolabile de la G6PD dans des cultures de cellules provenant de foie d'adulte et de poumon foetal; cependant lorsque l'enzyme est purifié partiellement, cette altération disparaît.

Les expériences réalisées sur la souris sont également contradictoires.

Wulf et Cutler (1975) ont trouvé une fraction thermolabile de la G6PD au niveau de cinq tissus de souris vieilles : le cerveau, la rate, le foie, le rein, le poumon.

Par contre, Yagil (1976) et Schofield et Hadfield (1978) n'ont pu montrer une augmentation de la thermolabilité de la G6PD dans le foie de souris âgées.

Bien au contraire, un accroissement de la stabilité de la G6PD a été mis en évidence par Evans (1977) sur des fibroblastes d'embryons de souris.

Plusieurs explications ont été avancées pour justifier ce manque de reproductibilité.

La diversité des systèmes et des méthodes employés a été mise en cause. On constate cependant que Duncan et al. (1977) et Pendergrass et al. (1976) qui ont utilisé le même type de cellules pour leurs expériences ont des résultats divergents.

La préparation des cellules diffère d'un laboratoire à l'autre; Pendergrass et al. (1976) et Yagil (1976) ont mis en cause la trypsinisation et la sonication des cellules (méthodes utilisées par Holliday et Tarrant (1972) qui provoqueraient une altération de la G6PD chez les cellules vieilles.

Cependant, bien que nous n'ayons utilisé aucune de ces deux méthodes lors de la préparation des cellules, une fraction thermolabile de la G6PD apparaît chez les cellules WI-38 vieilles (nos cellules ont été détachées du support de culture par un racloir et homogénéisées dans un homogénéiseur de Dounce).

Préalablement aux expériences qui vont être développées ci-dessous, nous avons testé l'effet de la sonication sur l'apparition de l'enzyme thermolabile et nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet de ce traitement sur la G6PD (résultat non montré).

Duncan et al. (1977) ont montré que la proportion d'enzyme thermolabile diminue lorsque les cellules vieilles sont gardées dans un état essentiellement non mitotique. D'autre part, le taux d'altération de la G6PD régresse lorsque des souris vieilles sont soumises à un jeûne (Wulf et Cutler, 1975).

Il semble donc que certaines conditions expérimentales pourraient influencer la quantité d'enzyme thermolabile et expliquer en partie les différences de comportement de la G6PD décrites dans la littérature.

Il est possible également que la thermolabilité de la G6PD dépende du milieu dans lequel l'enzyme se trouve. Des variations de la concentration en NADP^+ dans les tissus pourraient en effet être responsables des modifications de la thermolabilité de la G6PD (Erickson, 1974). Ce pourrait être le cas également pour les agents réducteurs qui stabilisent l'enzyme en maintenant ses ponts disulfures.

Les expériences de Kahn et al. (1977a) dans lesquelles ils montrent que la fraction thermolabile présente dans un homogénat de cellules, disparaît dans une préparation purifiée, suggèrent également une influence du milieu sur le comportement de la G6PD.

De nouveau, cette variabilité des résultats s'expliquerait mieux par des modifications posttraductionnelles que par des erreurs survenant au cours de la transcription ou de la traduction des protéines.

c) Mécanismes proposés pour les modifications post-traductionnelles

Plusieurs auteurs tentent d'expliquer l'altération des protéines par l'hypothèse des modifications post-traductionnelles (Rothstein, 1975, Gershon et Gershon, 1976, Dreyfus et al., 1977, Rothstein, 1977, Dreyfus et al., 1978, Gershon, 1979, Rothstein, 1979).

Notons dès maintenant que cette hypothèse ne constitue aucunement une tentative d'explication du vieillissement. En effet, si les modifications posttraductionnelles peuvent constituer un élément important dans ce phénomène, il n'est pas du tout certain qu'elles en soient la cause, ni qu'elles provoquent finalement la destruction des cellules (Dreyfus et al., 1977).

Les travaux relatifs aux modifications postraductionnelles peuvent être classés en deux groupes suivant l'origine donnée pour expliquer ces modifications.

1. Modifications impliquant l'addition ou l'élimination de groupements sur l'enzyme.

Un grand nombre de modifications posttraductionnelles qui se produisent dans des conditions normales ou pathologiques sont bien connues et caractérisées. Il s'agit entre autres de la glycosylation (Karn et al., 1973), l'oxydation des groupements SH (Green et al., 1971, Graff et al., 1978) la déamidation (Robinson et al., 1971, Robinson, 1974), l'enlèvement d'acides sialiques (Goldstone et al., 1971).

Une revue des modifications posttraductionnelles a été faite par Dreyfus et al. (1978). Nous n'en donnons ici que quelques exemples caractéristiques.

La déamination des groupements asparaginyll et glutaminyll pourrait d'après Robinson et al. (1971) avoir une influence sur la demi-vie des protéines. Ce processus semble en effet favoriser l'attaque hydrolytique des molécules qui possèdent ce type de groupements. La quantité des résidus glutaminyll et asparaginyll constituerait pour chaque protéine une horloge moléculaire (Robinson, 1974, 1979).

La modification de la G6PD au niveau des cellules sanguines peut avoir plusieurs origines. Ainsi la G6PD des globules rouges est apparentée à une forme native présente dans les leucocytes qui serait modifiée par protéolyse de résidus leucine et lysine (Kahn et al., 1977a).

Skala et al. (1979), ont d'autre part, montré qu'un produit de dégradation du NADP^+ (la phospho-adénosine diphospho-ribose) est capable de se lier de façon irréversible à la G6PD et de modifier son point isoélectrique. Cette forme "hyperanodique" obtenue in vitro est très semblable à celle retrouvée in vivo dans les lymphocytes et certaines cellules leucémiques (Kahn et al., 1975 et 1976b).

L'oxydation des groupements SH et méthionine constitue un mécanisme possible d'altération des protéines (Gershon, 1979). Une production exagérée de radicaux libres dans les cellules vieilles pourrait être à l'origine de l'accumulation de molécules défectueuses (Halliwell, 1978, Sheldrake, 1974).

Celle-ci serait due notamment à la formation de peroxyde, à la modification du potentiel rédox de la cellule, à l'oxydation des groupements SH et méthione (par exemple). Peu de preuves corroborent cependant cette hypothèse (Gershon, 1979).

La plupart des mécanismes cités ci-dessus entraînent des variations de la charge ou du poids moléculaire des protéines.

Nous avons souligné dans le second paragraphe de la discussion que peu de modifications de ce type ont été relevées au cours du vieillissement.

Il semble donc que ces altérations, si elles interviennent pour modifier certaines protéines, ne constituent pas un phénomène général dans le processus de vieillissement (Gershon, 1979).

2. Modifications impliquant un changement conformationnel

Rothstein (1979) a émis l'hypothèse que les modifications posttraductionnelles pouvaient être dues à des changements de conformation de l'enzyme ne faisant intervenir aucune réaction covalente.

L'énolase de Turbatrix aceti vieux montre par rapport à l'enzyme "jeune" une augmentation de l'absorbance spécifique à 280 nm. Cette variation n'est due ni à une oxydation des groupements SH, ni à d'autres réactions telles que la déamidation, la phosphorylation ou la protéolyse. De plus, l'énolase "jeune" peut se transformer en énolase "vieille".

Ces résultats suggèrent que, durant le vieillissement, l'enzyme "jeune" peut être converti en enzyme "vieux" sans changement dans la séquence des acides aminés et sans faire

intervenir de facteurs extrinsèques (Sharma et Rothstein, 1978 et 1980).

La phosphorylase du coeur de souris (Capasso et Zimmerman, 1980), peut se trouver sous forme de dimères ou de tétramères (la forme dimérique étant prédominante chez les organismes jeunes).

Une augmentation de la thermostabilité de cet enzyme chez les souris vieilles serait due au passage des molécules enzymatiques sous forme tétramérique.

Duncan et al. (1977) expliquent également l'apparition d'une fraction thermolabile de la G6PD chez les cellules WI-38 vieilles par une transformation des dimères en tétramères.

Peu de recherches ont été effectuées sur les modifications de conformation; il serait certainement très intéressant de généraliser ce type de recherches à d'autres enzymes.

Les types différents d'altération que nous avons étudiés entraînent en général une déstabilisation des enzymes qui les rend plus sensibles à la protéolyse, à la dénaturation à la chaleur, etc,...

Goldberg (1972) a d'autre part montré chez Escherichia coli, que les molécules modifiées sont dégradées plus rapidement que les molécules normales.

Si l'on admet l'hypothèse des modifications posttraductionnelles, plusieurs questions restent posées : comment expliquer l'accumulation de protéines altérées alors que celles-

ci selon Goldberg (1972) devraient être rapidement détruites ?

Comment expliquer l'absence d'altération de certains enzymes chez les cellules vieilles ?

Deux réponses différentes peuvent être apportées.

A. Rothstein (1975, 1977, 1979) a imaginé plusieurs étapes sur le chemin qui mène de l'enzyme normal à la protéolyse (voir figure 30).

Les formes modifiées (enzyme thermolabile, CRM, etc...) retrouvées chez les organismes vieux seraient des intermédiaires conduisant à l'inactivation ou à la protéolyse.

Le nombre, la stabilité, les types d'intermédiaires varieraient d'un enzyme à l'autre. C'est ainsi que certains enzymes auraient comme intermédiaire une forme modifiée et une forme inactive (aldolase purifiée de T.aceti voir table IV),, d'autres n'auraient que des formes inactives (lactate déshydrogénase de l'homme et du rat, voir table IV).

L'absence de modifications enzymatiques (telle que nous l'avons observée pour les enzymes mitochondriaux et lysosomiaux) s'expliquerait de deux manières radicalement opposées. Ces enzymes seraient très stables et difficilement altérables ou au contraire, tellement instables ou modifiés qu'il serait impossible de les détecter. Cette dernière hypothèse s'expliquerait si la demi-vie de l'enzyme était très courte ou si les sites actifs et antigéniques étaient tous les deux détériorés.

L'accumulation des formes altérées serait due à un ralentissement de la vitesse de renouvellement (turnover)

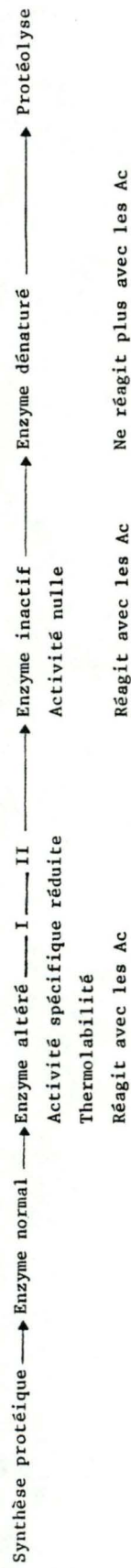


Figure 30.- Modèle d'altération des enzymes au cours du vieillissement selon Rothstein (1979).

causé par exemple par une diminution du catabolisme. Une augmentation de la demi-vie a été mise en évidence pour l'aldolase de Turbatrix aceti. (Zeelon et al., 1973) et pour l'aldolase B de souris (Reznick et al., 1981).

La divergence des résultats obtenus sur les altérations enzymatiques pourrait donc s'expliquer par des variations du taux de renouvellement des différents systèmes utilisés.

Chez les bactéries, la dégradation est plus lente ou plus rapide selon que ces organismes sont en pleine croissance ou non (Goldberg, 1972). Les expériences de Duncan et al. (1977) montrent que la fraction thermolabile de la G6PD de cellules vieilles est plus élevée lorsque celles-ci se divisent, que lorsqu'elles sont en état stationnaire. Ces résultats pourraient dépendre également d'un changement dans les vitesses de renouvellement.

Cependant aucune preuve formelle n'a encore été donnée concernant une diminution de la vitesse de renouvellement au cours du vieillissement. Les résultats sur ce sujet sont au contraire très contradictoires (Goldstein et al., 1976, Dell'Orco et Guthrie, 1976, Matthews et al., 1975, Wiederanders et al., 1978, Bradley et al., 1976).

B. Une deuxième explication basée également sur le modèle de Rothstein (1975, 1977 et 1979) serait la suivante : on pourrait imaginer qu'une stabilisation des molécules altérées soit due à une modification du milieu dans lequel

l'enzyme se trouve, telle qu'une variation du pH, du potentiel-rédox ou la présence de certaines substances.

Les milieux étant différents d'un compartiment à l'autre, des enzymes comme les enzymes des mitochondries et des lysosomes pourraient être épargnés alors que ceux du cytoplasme seraient modifiés.

Nous allons maintenant analyser les résultats que nous avons obtenu sur la G6PD et montrer comment ceux-ci s'intègrent dans les théories développées ci-dessus.

III. L'ALTERATION DE LA G6PD

Dans la première partie de notre travail, nous avons vu que la G6PD présente, chez les cellules WI-38 vieilles, une fraction enzymatique plus thermolabile. L'hypothèse d'une modification posttraductionnelle a été avancée pour expliquer ce type d'altération.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous nous sommes efforcés d'expliquer le mécanisme d'apparition d'une fraction thermolabile de la G6PD et de confirmer ainsi cette hypothèse.

a) Apparition in vitro de l'altération de la G6PD

L'altération de diverses protéines in vitro a déjà été mise en évidence. La G6PD de globules rouges vieux présente des formes enzymatiques dont le point isoélectrique est abaissé par rapport aux autres cellules sanguines. (Kahn et al., 1973, 1974 et 1977c).

Des formes "hyperanodiques" de l'enzyme ont pu être obtenues in vitro après incubation à 37°C, d'extraits leucocytaires et érythrocytaires (Kahn et al., 1973, 1974, 1976a, 1976b, 1978).

Ce type de modification apparaît également lorsque la G6PD est conservée longtemps sous forme de précipité dans du sulfate ammonique concentré (Dreyfus et al., 1978).

La conformation et la thermolabilité de l'énolase varient au cours du vieillissement de Turbatrix aceti. L'énolase "jeune" a pu être transformée in vitro en énolase "vieille" par passages répétés sur tamis moléculaire (Sharma et Rothstein, 1978).

Les altérations apparues in vitro s'accompagnent d'une perte d'activité des enzymes étudiés (Kahn et al., 1973, 1974, 1977b, Sharma et Rothstein, 1978).

Cette observation se vérifie également dans toutes les expériences que nous avons réalisées. Cette perte d'activité liée à l'augmentation de la thermolabilité et à une plus grande sensibilité à la protéolyse nous laisse penser que ces formes modifiées pourraient représenter des intermédiaires dans le processus d'inactivation de l'enzyme.

Partant de l'hypothèse que l'altération de la G6PD fait intervenir un facteur physiologique, nous nous sommes demandé s'il était possible d'induire chez les cellules jeunes une modification de la G6PD semblable à celle qui apparaît naturellement chez les cellules vieilles. Nous avons montré que cette altération apparaissait en quelques heures, lorsqu'un surnageant, un homogénat ou une suspension de cellules WI-38 jeunes étaient incubés à 4°C (figures 9 et 10). A cette température, la synthèse protéique est arrêtée et donc, l'apparition d'une forme altérée de la G6PD ne peut s'expliquer que par une modification de l'enzyme déjà synthétisé.

Si l'enzyme altéré apparaît bien dans les trois systèmes de travail utilisé, le pourcentage d'altération diffère de l'un à l'autre et est d'autant plus élevé que la structure cellulaire est conservée (figure 10). Il faut noter cependant une certaine variabilité dans la vitesse d'apparition de cette altération d'une expérience à l'autre.

Une augmentation de la fraction thermolabile de la G6PD a pu être obtenue in vitro chez des cellules vieilles.

L'évolution est cependant moins marquée que chez les cellules jeunes puisqu'une forme modifiée est déjà présente au départ (figure 11). L'altération de l'enzyme s'accompagne de nouveau d'une inactivation de celui-ci.

Kahn et al. (1977a) ont montré qu'une fraction thermolabile pouvait être obtenue en incubant de la G6PD exogène purifiée, en présence d'extraits de fibroblastes de poumon sénescents. Un facteur présent uniquement dans les cellules vieilles serait responsable de cette modification.

Nos expériences montrent par contre que ce facteur n'est pas spécifique des cellules vieilles puisque l'altération peut être également provoquée chez les cellules jeunes. Cette apparition étant d'ailleurs dépendante de nombreux facteurs, pourrait expliquer le résultat négatif de Kahn et al. (1977a) sur les cellules jeunes.

1. Mobilité électrophorétique de l'enzyme altéré

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été utilisée afin d'analyser les diverses formes de la G6PD et de détecter éventuellement une variation de sa charge au cours du vieillissement.

La population enzymatique provenant d'un surnageant de cellules WI-38 a pu être séparée en trois bandes distinctes (figure 16). Les deux bandes migrant le plus rapidement représentent les formes dimériques et tétramériques de l'enzyme (Duncan et al., 1977, Hizi et Yagil, 1974, Holten, 1972).

La bande la plus lente serait suivant Hizi et Yagil (1974), un multimère de la G6PD et suivant Duncan et al., (1977), une protéine non spécifique (l'hexose phosphate déshydrogénase).

Cette forme mineure n'apparaît, chez les cellules jeunes comme chez les cellules vieilles, que lorsque des extraits cellulaires frais ont été utilisés. Cette dernière observation avait déjà été faite par Hizi et Yagil (1974) et Schofield et Hadfield (1978).

Au cours de nos expériences, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences dans la mobilité électrophorétique de la G6PD entre les cellules vieilles et les cellules jeunes.

L'altération de la G6PD ne semble donc pas entraîner de modification de la charge de l'enzyme. Les réactions telles que la déamidation ou des protéolyses partielles, qui changeraient la charge des protéines, ne peuvent donc pas expliquer l'apparition d'une forme thermolabile de la G6PD.

Lors de l'incubation prolongée d'extraits cellulaires à 4°C, aucune bande supplémentaire n'apparaît. Cependant, l'intensité des différentes bandes diminue fortement et de façon inégale au cours du temps. En effet, la coloration de la bande tétramérique a presque disparu après 24 h alors que la bande dimérique est encore bien visible (figure 16). Il apparaît donc en même temps que l'inactivation et l'altération de l'enzyme, un déplacement de l'activité enzymatique, des formes tétramériques vers les formes dimériques (Hizi et Yagil, 1974).

Les résultats obtenus par Duncan et al. (1977) indiquant

que l'altération de la G6PD résulterait du passage de l'enzyme de la forme dimérique vers la forme tétramérique n'ont pu être vérifiés dans notre laboratoire. Non seulement la proportion des dimères et des tétramères est identique chez les cellules vieilles et chez les cellules jeunes, mais de plus, l'altération provoquée in vitro semble être accompagnée au contraire du passage des tétramères vers les dimères.

2. Effet de la protéolyse et des organites sub-cellulaires

Dans la première partie de la discussion, nous avons vu que la protéolyse partielle pouvait être un des mécanismes responsables des modifications enzymatiques (Kahn et al., 1977c; Dreyfus et al., 1978).

Pour tester l'action éventuelle d'enzymes protéolytiques sur la G6PD, nous avons incubé un extrait de cellules jeunes en présence d'un jus de lysosomes préparé à partir de foie de rat (table III).

Aucune fraction thermolabile n'a pu être induite dans les conditions expérimentales utilisées.

Ces résultats suggèrent que la protéolyse lysosomiale ne jouerait aucun rôle dans l'altération de la G6PD.

L'incubation d'un surnageant provenant de cellules jeunes en présence des différentes fractions N, ML, P, S obtenues par centrifugation différentielle d'un homogénat de cellules vieilles, confirme ces résultats (table III). En effet, la fraction ML, enrichie en lysosomes, n'influence pas l'apparition de la G6PD altérée.

Il semble également que la fraction N, enrichie en noyaux, et la fraction microsomiale P n'aient aucun effet.

L'enzyme incubé en présence d'un surnageant de cellules vieilles se modifie légèrement.

Cependant, la proportion d'enzyme des cellules jeunes qui serait thermolabile est pratiquement nulle.

En conclusion, la protéolyse lysosomiale ne semble jouer aucun rôle dans l'altération de la G6PD et à part la fraction soluble S, aucune des fractions N, ML, P provenant de cellules vieilles, n'est capable de modifier la G6PD. Les organites subcellulaires n'interviendraient donc pas dans ce phénomène. Le cytosol pourrait quant à lui, contenir un facteur responsable de l'altération.

3. Effet de l'albumine

Aux fortes dilutions, la présence d'albumine peut avoir une influence sur la stabilité de la G6PD (Marks et al., 1961, Kirkman et Hendrickson, 1962). Lorsque l'on compare les courbes de thermolabilité réalisées sur des solutions purifiées de la G6PD avec ou sans albumine dans le milieu, l'on observe une protection de l'enzyme par l'albumine qui se marque par une réduction de la vitesse de dénaturation de la G6PD (résultats non montrés).

Cependant, l'incubation prolongée d'un homogénat de cellules jeunes à 4°C en présence d'une forte concentration d'albumine bovine (2 mg/ml) n'empêche pas la G6PD de s'inactiver et de s'altérer. L'activité résiduelle et le pourcentage d'enzyme thermolabile après 24 heures sont semblables pour une préparation cellulaire incubée à 4°C avec ou sans albumine.

L'albumine ne joue donc pas un rôle de protection de la G6PD dans le processus d'inactivation et d'apparition de l'altération que nous étudions dans ce travail.

4. Protection due au pH

Les résultats montrent que le pH possède une influence importante sur l'inactivation et l'apparition d'une fraction thermolabile de la G6PD.

En effet, celles-ci se produisent dans un surnageant, une suspension ou un homogénat de cellules jeunes à pH 7,4 mais non à pH 6,5 (figure 13).

L'effet du pH sur l'apparition d'une forme altérée de la G6PD in vitro a également été étudié par Kahn et al. (1976b, 1978), sur des cellules sanguines. Leurs résultats sont différents. En effet, l'apparition de formes "hyperanodiques" modifiées de la G6PD se produit au contraire aux pH plus acides (Kahn et al., 1973, 1974, 1976b, 1978). La plupart de leurs expériences ont été réalisées à pH 6,4 (pH pour lequel la G6PD est protégée dans les conditions que nous avons utilisées). Cette différence de résultats suggère que les deux phénomènes étudiés sont tout à fait différents.

La G6PD est un enzyme multimérique qui peut exister sous forme de dimères et de tétramères actifs ou être dissocié en monomères inactifs. Ces différentes formes sont interconvertibles. L'équilibre entre les dimères et les tétramères est influencé par la force ionique et le pH (Cohen et Rosemeyer, 1969, Cancedda et al., 1973, Bonignore et al., 1971; De Flora et al., 1974).

A pH plus acide (inférieur à pH 7,2 dans le cas où la force ionique est faible), la forme tétramérique est prédominante (Cohen et Rosemeyer, 1969). Bonsignore et al. (1971b) ont montré que l'inactivation et la dissociation de la G6PD sont maximales à des valeurs de pH pour lesquelles l'équilibre est déplacé vers les dimères.

On peut donc supposer que l'incubation de la G6PD à pH 6,5 stabilise l'enzyme en le maintenant sous forme de tétramères.

Le pH ne serait cependant pas le seul facteur influençant l'inactivation de la G6PD. En effet, un enzyme purifié, incubé 24 heures à 4°C dans les conditions décrites antérieurement pour un homogénat de cellules, ne s'inactive pas quel que soit le pH du milieu d'incubation (figure 12).

Le pH agirait donc par l'intermédiaire d'un autre facteur et son effet ne serait que secondaire. Ce facteur aurait une action protectrice sur la G6PD à pH acide ou au contraire, il provoquerait l'inactivation et l'altération de l'enzyme à pH basique.

5. Protection par le NADP⁺

Le NADP⁺ représente pour la G6PD une molécule d'une importance capitale. Il intervient comme coenzyme dans les réactions catalytiques et son effet protecteur sur la G6PD apparaît à différents niveaux : il protège l'enzyme contre l'inactivation (Cohen et Rosemeyer, 1969, De Flora et

al., 1974, Cancedda et al., 1973, Chung et Langdon, 1963, Kirkman, 1962, Bonsignore et al., 1971b), contre certains inhibiteurs (Chung et Langdon, 1963), et il augmente sa thermostabilité (Marks et al., 1961, Cancedda et al., 1973).

En fait, son rôle serait non seulement catalytique mais encore structurel : il stabiliserait une structure oligomérique, catalytiquement active.

L'influence considérable du NADP^+ sur la G6PD a également été mise en évidence dans nos expériences. L'incubation d'un homogénat de cellules jeunes à 4°C en présence de $\text{NADP}^+ 10^{-3} \text{ M}$ prévient l'inactivation de l'enzyme et l'apparition de la forme thermolabile de la G6PD (figures 14 et 15).

Le NADP^+ stabilise en même temps les formes dimériques et principalement les formes tétramériques. L'équilibre entre les formes monomériques d'une part et les formes oligomériques d'autre part, est affecté par la concentration en NADP^+ (Cancedda et al., 1973). L'inactivation de la G6PD dans un homogénat de cellules s'expliquerait donc bien si l'on admettait que cette inactivation est produite par une transformation de l'enzyme en monomères; le NADP^+ inhiberait cette inactivation en stabilisant les formes dimériques et tétramériques. Les électrophorèses réalisées après 24 heures d'incubation à 4°C , en présence de NADP^+ montrent effectivement une conservation des tétramères et des dimères par rapport au contrôle (figure 16).

Nos résultats sur des homogénats de fibroblastes humains peuvent être rapprochés de ceux obtenus par Carson et al. (1959) qui ont montré une rapide inactivation de la

G6PD contenue dans des lysats d'érythrocytes. Cette perte d'activité qui est empêchée par l'addition de NADP^+ , serait due, d'après Chung et Langdon (1963) à la destruction du NADP^+ .

Les dosages du NADP^+ réalisés au cours des expériences confirment cette hypothèse. En effet, le NADP^+ ajouté au milieu, est consommé au fil du temps et lorsque sa concentration est quasi nulle, l'enzyme commence à s'inactiver (voir figure 14). La disparition du NADP^+ peut avoir plusieurs causes. Le dosage du NADP^+ montre que la perte de molécules dans le milieu n'est pas due à sa réduction en NADPH. On n'observe en effet pas d'augmentation de NADPH correspondant à la diminution de NADP^+ (résultats non montrés).

La disparition de la molécule pourrait s'expliquer par son instabilité à des pH supérieurs à 7. L'effet du pH sur la G6PD (paragraphe précédent) s'expliquerait ainsi par son influence sur la stabilité du NADP^+ .

La présence de NADP^+ hydrolase dans l'homogénat de cellules pourrait également être à l'origine de la destruction du NADP^+ (Marks et al., 1961, Bonsignore et al., 1971b).

L'effet le plus marquant du NADP^+ dans notre travail est son effet de prévention de l'apparition d'une forme thermolabile de la G6PD. Bien que le mécanisme d'altération de la G6PD ne soit probablement pas identique dans les expériences réalisées par Kahn et ses collaborateurs, ils ont pu également mettre

en évidence un effet de protection de la G6PD contre l'apparition de forme hyperanodique pour de fortes concentrations en NADP^+ (Kahn et al., 1978).

Les expériences successives sur les facteurs influençant l'apparition de l'altération de la G6PD in vitro indiquent qu'il existe un lien entre l'apparition d'une forme thermolabile d'une part, l'inactivation de l'enzyme et la disparition des formes dimériques et tétramériques d'autre part. Cette constatation sera confirmée et développée dans les chapitres suivants. Le NADP^+ quant à lui, occupe une place importante au niveau de tous ces mécanismes puisque sa disparition entraîne l'apparition de tous les phénomènes décrits précédemment.

Une protection similaire à celle exercée par le NADP^+ est observée pour le NADPH (protection contre l'inactivation et l'altération, et la stabilisation des formes tétramériques). Cependant, nous ne savons pas si cette action lui est propre ou si elle est due à une légère fraction de la molécule qui se trouverait sous forme oxydée.

b) Réversibilité de l'altération - Argument en faveur d'une modification conformationnelle de la G6PD

Au cours de nos expériences, nous avons pu montrer que l'apparition de la G6PD thermolabile, la disparition des dimères et des tétramères, l'inactivation de l'enzyme in vitro, constituent des réactions réversibles. La diminution du pH du milieu d'incubation (de 7,4 à 6,5) ou l'addition de NADP^+ font disparaître totalement (addition de NADP^+) ou en partie (changement de pH) les modifications apparues (figure 17 et figure 18).

L'effet du NADP^+ est le plus remarquable puisqu'après 24 heures, l'enzyme retrouve entièrement les propriétés qu'il possédait avant l'incubation.

La réversibilité de l'inactivation, de la disparition des dimères et des tétramères a déjà été étudiée précédemment (Chung et Langdon, 1963, Kirkman et Hendrickson, 1962, Bonsignore et al., 1971b).

Chung et Langdon ont provoqué l'inactivation de la G6PD par un traitement au $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ et ils ont obtenu une réactivation de l'enzyme par addition de NADP^+ . Leurs expériences ont montré que la perte d'activité était liée à la dissociation des formes actives de l'enzyme en monomères catalytiquement inactifs, provoquée par l'enlèvement du coenzyme de la G6PD.

Inversément, l'addition de NADP^+ favoriserait la réaggrégation des monomères en oligomères actifs.

Les électrophorèses que nous avons réalisées montrent que la réactivation de l'enzyme en présence de NADP^+ s'accompagne également d'une augmentation de formes dimériques et tétramériques (figure 19). Nous verrons plus loin que ce phénomène est bien dû à la réaggrégation des monomères apparus lors de l'inactivation de la G6PD.

Bien que le pH intervienne également sur l'équilibre dimères-tétramères, nous n'avons pas trouvé de travaux signalant son influence sur la transformation des monomères en oligomères. Chung et Langdon (1963) par contre, ont montré que la réactivation de l'enzyme peut se faire simplement par une augmentation de la température qui provoquerait un changement de la configuration de l'enzyme. Le NADP^+ se combinerait alors avec l'enzyme pour stabiliser

la conformation active.

Il est possible que l'effet du pH se produise par un mécanisme semblable à celui de la température. Cela expliquerait le faible regain d'activité (30 %) obtenu après 24 heures d'incubation à pH 6,5. Le changement de pH du milieu entraînerait une modification conformationnelle de l'enzyme qui le rendrait actif. Cependant, cette forme si elle n'est pas stabilisée par le NADP^+ , aurait tendance à s'inactiver d'où l'observation d'une réactivation partielle de l'enzyme et d'une chute d'activité après 30 heures d'incubation (figure 17).

La diminution du pH et l'addition de NADP^+ dans le milieu d'incubation, font également disparaître la forme thermolabile de la G6PD apparue in vitro (figures 17 et 18). Fait plus important encore, la forme altérée de la G6PD présente naturellement chez les cellules vieilles, peut être transformée in vitro en enzyme normal lorsqu'elle est placée dans des conditions similaires (figures 20, 21 et 22). Cependant, la réversibilité de l'altération de la G6PD ne semble pas définitive; les figures 20 et 22 montrent une réapparition de la forme thermolabile au bout d'un certain temps.

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces expériences.

1.- La forme thermolabile de la G6PD apparue in vitro chez les cellules jeunes et celle qui est présente chez les cellules vieilles in vivo, ont un comportement identique et peuvent être l'une et l'autre retransformées, dans des conditions similaires, en enzyme normal. Un même mécanisme serait

donc à l'origine de ces altérations.

- 2.- La disparition de la forme modifiée de la G6PD chez les cellules vieilles n'est pas définitive et est difficile à obtenir. Les conditions de milieu des cellules vieilles paraissent donc favorables à la présence d'un enzyme thermolabile.
- 3.- La réversibilité de l'altération prouve que la modification apparue ne fait pas intervenir des réactions covalentes semblables à celle obtenue par l'adénine diphospho-ribosylation qui explique l'apparition des formes "hyperanodiques" de la G6PD mises en évidence par Kahn et ses collaborateurs (Kahn et al., 1978, Skala et al., 1979).

Le lien qui existe entre l'inactivation de la G6PD, l'altération et la transformation de ses diverses formes, nous a conduit à l'hypothèse que la forme modifiée constituerait une étape intermédiaire dans l'inactivation de la G6PD.

Plusieurs auteurs ont émis cette possibilité (Rothstein, 1979, Gershon, 1979, Dreyfus et al., 1978) mais peu de recherches ont montré que les modifications apparues étaient réversibles.

Les résultats obtenus par Sharma et Rothstein (1978) sont toutefois très proches des nôtres. Ils ont en effet montré que l'énolase du nématode Turbatrix aceti présente, chez les organismes vieux, des modifications conformationnelles. La forme modifiée est plus thermolabile et peut être transformée in vitro en forme inactive que l'on retrouve uniquement chez les vieux organismes.

Comme la G6PD, l'énolase "jeune" peut être transformée in vitro en énolase "vieille". L'enzyme altéré serait comme pour la G6PD un intermédiaire de la dégradation de l'énolase.

c) La G6PD altérée comme intermédiaire au cours de l'inactivation de l'enzyme

La méthode de filtration sur tamis moléculaire nous a permis de mettre en évidence une transformation des formes actives de la G6PD en monomères inactifs lors de l'incubation prolongée d'un extrait cellulaire à 4°C. Bien qu'imparfaite, la séparation des tétramères, dimères et monomères, nous a permis de montrer une distribution des formes thermolabiles correspondant à celle des dimères. Il faut donc admettre que la forme moléculaire de l'enzyme altéré est un dimère. (figure 25).

Ces résultats contredisent ceux obtenus par Duncan et al. (1977) qui avaient conclu que la fraction thermolabile de la G6PD présente chez les cellules vieilles était constituée de tétramères. Ces auteurs ont mesuré la thermolabilité des dimères et des tétramères en étudiant par électrophorèse la vitesse de disparition des bandes correspondant à chacune de ces deux formes. Cependant, rien ne prouve que la disparition des tétramères qu'ils observent n'est pas due à leur transformation en dimères plutôt qu'à leur inactivation. Ces deux transformations pourraient même être simultanées et accélérer encore la disparition des tétramères sans que, pour autant, ces formes soient plus thermolabiles. Bonsignore et al. (1971b) ont montré au contraire que les dimères étaient plus sensibles à certains agents dissociants tels que la NADP^+ hydrolyse alors que les tétramères étaient plus résistants.

L'effet du NADP^+ sur les monomères et les dimères modifiés, les courbes de thermolabilité qui en résultent ainsi que la cinétique d'apparition de l'enzyme altéré par rapport à l'enzyme normal et à l'enzyme inactif, nous permettent de proposer un modèle basé sur les observations suivantes.

- 1.- L'étude électrophorétique a montré que les monomères mis en présence de NADP^+ sont réactivés en dimères qui sont partiellement altérés comme nous le montrent les courbes de thermolabilité (figures 25, 26 et 27).
- 2.- Les dimères altérés au départ retrouvent leur forme normale lorsqu'ils sont incubés en présence du NADP^+ (figures 25 et 27).
- 3.- L'évolution des formes actives altérées et inactives lors de l'incubation d'extraits cellulaires à 4°C s'apparente à la cinétique d'une réaction consécutive. L'enzyme normal se transformerait en enzyme altéré qui lui-même donnerait la forme inactive (figure 28).

La figure 31 présente un modèle dans lequel nous avons tenu compte en plus de nos résultats, des divers facteurs qui sont connus comme influençant l'équilibre de ces réactions.

L'inactivation de la G6PD s'effectuerait par une suite de réactions réversibles influencées chacune par différents facteurs tels que le pH, la force ionique, la température, la concentration en NADP^+ , etc...

La forme thermolabile serait, comme nous l'avions supposé dans le paragraphe précédent, une forme intermédiaire apparaissant au cours de l'inactivation de la G6PD.

On peut imaginer qu'il s'agisse d'un dimère qui soit sur

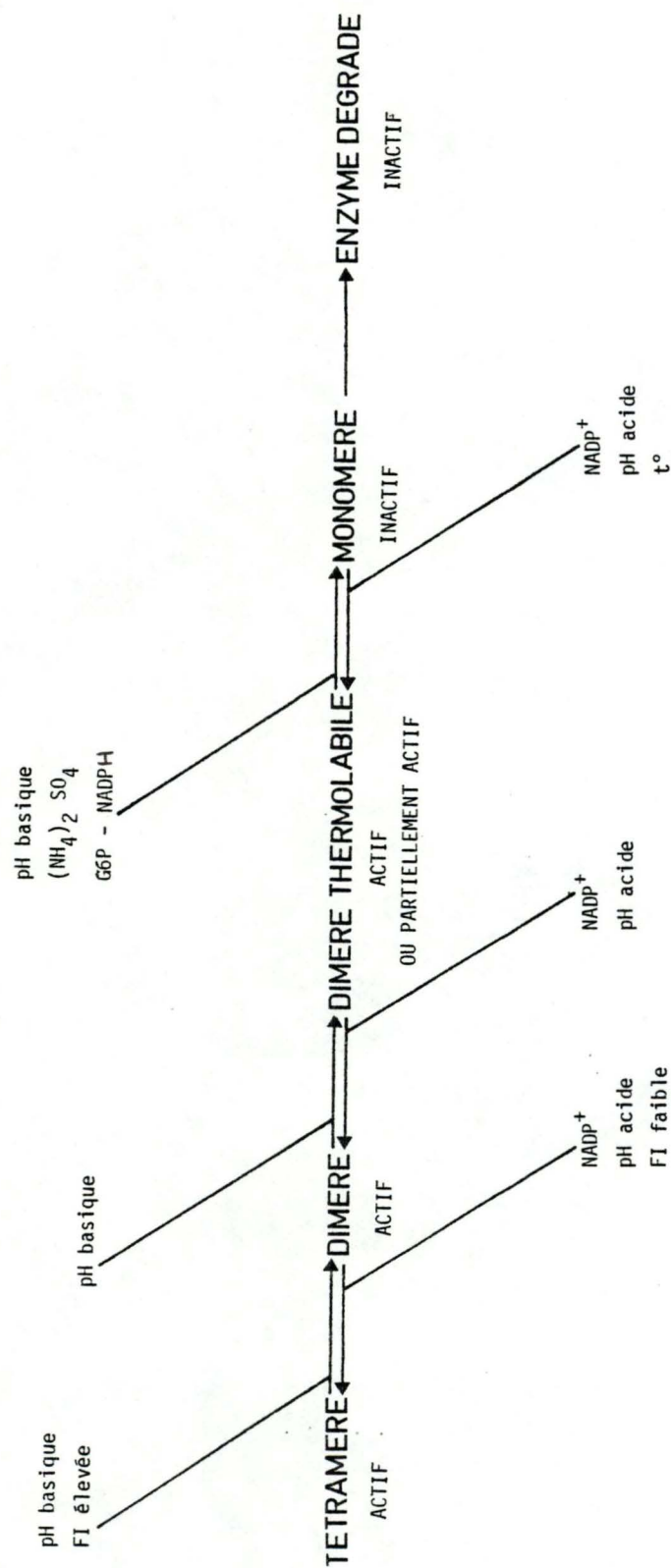


Figure 31.- Modèle d'altération de la G6PD au cours du vieillissement des fibroblastes WI-38 en culture.

le point de se dissocier (ou de s'associer) et qui, bien qu'étant sous forme dimérique, n'ait plus la conformation stable (active ou non) du dimère normal. Nous avons en effet remarqué que dans certaines conditions, l'activation de l'enzyme "altéré" ne se réalisait qu'au moment du chauffage à 59°C (voir figure 15). Ce résultat montre bien que l'enzyme altéré n'était pas actif dans le milieu de départ et qu'il n'a acquis son activité qu'au moment du chauffage à 59°C. Dans les conditions habituelles de travail cependant, ce phénomène n'était pas perceptible, c'est-à-dire que le dimère était actif mais non encore stabilisé.

Soulignons que ce modèle est semblable à celui de Rothstein (1975-1977) expliquant l'altération des enzymes au cours du vieillissement (figure 30). Cancedda et al. (1973) avaient déjà envisagé la présence de deux types de dimères caractérisés par une différence au niveau de leur activité, de leur thermostabilité et de leur affinité pour le NADP^+ .

Le NADP^+ aurait une influence importante sur le mécanisme qui mène à l'inactivation de la G6PD puisqu'il interviendrait dans chacune des étapes.

Dans l'optique de ce modèle, il est intéressant de noter qu'Erickson (1974) a montré que des souches de souris contenant du NADP^+ en faible quantité, possèdent également moins de molécules de G6PD et que de plus cet enzyme montre une thermolabilité augmentée. Il est difficile de savoir s'il y a un ou plusieurs facteurs qui jouent un rôle dans l'apparition de l'altération.

Chez les cellules vieilles, on peut supposer en tout cas, que l'altération résulte d'une modification du milieu qui favorise l'équilibre vers la formation de la forme thermolabile. Les dosages de NADP^+ total réalisés au laboratoire sur les cellules montrent que la quantité de coenzyme est effectivement plus faible chez les cellules vieilles, ce qui favoriserait le déplacement de l'enzyme des formes tétramérique et dimérique vers la forme thermolabile et la forme monomérique. Il serait cependant étonnant que ce soit le seul facteur important dans ce mécanisme.

DISCUSSION GENERALE

Les nombreuses théories émises pour expliquer le vieillissement et la mort des organismes sont plus facilement testées sur un système simplifié tel que la culture de cellules; nous avons tenté, dans notre travail, de vérifier sur un point bien particulier, une théorie du vieillissement : la théorie de l'erreur catastrophique émise par Orgel en 1963 et développée en 1973.

Sa première théorie restreinte explique le vieillissement par l'apparition d'erreurs au cours de la synthèse protéique. Nos résultats apportent deux arguments à l'encontre de celle-ci, du moins en tant qu'explication des altérations enzymatiques. Tout d'abord, nous avons montré que les modifications apparues chez les cellules sénescen-tes ne touchent pas tous les enzymes et n'apparaissent pas au hasard comme le suggère cette théorie. En effet, les enzymes cytoplasmiques semblent préférentiellement atteints par ces altérations. Par contre, certains enzymes des lysosomes, des mitochondries et des peroxy-somes sont épargnés ; le deuxième argument est décisif. En effet, nos expériences ont mis en évidence que la fraction thermolabile de la G6PD (signe d'une altération de l'enzyme), n'apparaît pas durant la synthèse de cette protéine mais après celle-ci.

Nos résultats peuvent cependant être inclus dans la théorie de l'erreur catastrophique généralisée décrite par Orgel en 1973. Les erreurs responsables du vieillissement pourraient avoir des origines multiples telles que l'action des radicaux libres, les mutations somatiques, les modifications du turnover, de la synthèse protéique, etc... Cette hypothèse n'est donc pas incompatible avec le caractère postsynthétique de l'altération puisque

n'importe quel type de modification: pourrait provoquer le vieillissement. La ségrégation des modifications enzymatiques dans certains compartiments subcellulaires peut également s'expliquer dans le cadre de cette théorie. Les enzymes des organites subcellulaires protégés par une membrane ne seraient pas touchés par certaines modifications apparaissant au niveau du cytoplasme. Comme nous l'avons montré, l'apparition d'une fraction thermolabile de la G6PD in vitro dépend fortement des conditions de pH et de concentrations en NADP^+ . Il est possible que la variation d'un de ces deux facteurs influence défavorablement l'enzyme au cours du vieillissement in vivo.

La présence de l'enzyme altéré ne serait donc pas la cause fondamentale du vieillissement mais plutôt une conséquence des modifications apparues à un autre niveau dans le métabolisme.

L'idée d'une rétroaction positive avancée par Orgel (1963) pour justifier l'accumulation des erreurs pourrait s'appliquer dans le cas de la G6PD. En effet, un mauvais fonctionnement de cet enzyme (le premier de la chaîne des pentoses-phosphate) pourrait entraîner d'autres modifications dont les conséquences seraient désastreuses pour la cellule. Par exemple, un manque de NADP^+ ou de ribose-5-phosphate résulterait en une déficience de la synthèse de macromolécules essentielles telles que les acides nucléiques (déficience en ribose-5-phosphate), en lipides et en protéines (déficience en NADPH).

Le maintien du potentiel réducteur de la cellule dû à la présence de glutathion réduit, ne sera plus assuré si la chaîne des pentoses-phosphate ne produit plus de NADPH en quantité suffisante.

L'oxydation des groupements sulfhydryls de certains enzymes serait la conséquence d'un déséquilibre du potentiel rédox. Toutes ces transformations pourraient donc atteindre un seuil critique où elles empêcheraient la cellule de fonctionner normalement. Nous pouvons donc imaginer une suite d'événements qui cadrent bien avec la théorie d'Orgel.

Nos résultats, s'ils peuvent s'analyser dans l'optique de l'erreur catastrophique généralisée, ne sont cependant pas en contradiction avec la théorie du vieillissement programmé par la régulation des gènes. En effet, une régulation des gènes qui conduirait à la variation de l'activité de certains enzymes pourrait ralentir, par exemple, le taux de renouvellement des molécules. Ces protéines dont la demi-vie serait prolongée seraient plus susceptibles d'être modifiées par divers facteurs après leur synthèse; ce pourrait être le cas de la G6PD. Dans cette perspective, il n'y a pas de frontières bien nettes entre la théorie de l'erreur et la théorie du vieillissement programmé. Les différences observées entre les durées de vie des différentes espèces laissent cependant supposer que même s'il existe réellement une erreur catastrophique à l'origine du vieillissement et de la mort des cellules, ces deux phénomènes reposent sur une base génétique dont l'énigme reste à élucider. Les modifications que nous avons étudiées ne seraient ainsi qu'une des multiples manifestations d'un processus fondamental de la biologie dont la compréhension nous échappe encore.

BIBLIOGRAPHIE

- ABSHER, P.M., ABSHER, R.G., et BARNES, W.D. (1974) - Genealogies of clones of diploid fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 88, 95-104.
- AMAR-COSTESEC, A., BEAUFAY, H., WIBO, M., THINES-SEMPOUX, D., FEYTMANS, E., ROBBI, M. et BERTHET, J. (1974) - Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. II. Preparation and composition of the microsomal fraction. *J. Cell Biol.* 61, 201-212.
- ANDREWS, P. (1965) - The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 96, 595-606.
- AZOUIGH-HOUBEN, A. et REMACLE, J. (1981) - Molecular mechanism of the glucose-6-phosphate dehydrogenase in ageing human fibroblasts. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 89, B47-B48.
- BAIRD, M.B., SAMIS, H.V., MASSIE, H.R. et ZIMMERMAN, J.A. (1975) - A brief argument in opposition to the Orgel hypothesis. *Gerontologia* 21, 57-63.
- BAUDHUIN, P., BEAUFAY, H., RAHMAN-LI, Y., SELLINGER, O.Z., WATTIAUX, R., JACQUES, P. et de DUVE, C. (1964) - Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, β -aminoacid oxidase and catalase in rat liver tissue. *Biochem. J.* 92, 179-184.
- BONSIGNORE, A., CANCEDDA, R., LORENZONI, I., COSULICH, M.E. et DE FLORA, A. (1971a) - Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase - Physical properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 94-101.
- BONSIGNORE, A., CANCEDDA, R., NICOLINI, A., DAMIANI, G. et DE FLORA A. (1971b) - Metabolism of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. VI. Interconversion of multiple molecular forms. *Arch. Biochem. Biophys.* 147, 493-501.
- BOWMAN, P.D. et DANIEL, C.W. (1975) - Aging of human fibroblasts in vitro : surface features and behavior of aging WI-38 cells. *Mech. Age.Dev.* 4, 147-158.

- BOWMAN, P.D., MEEK, R.L. et DANIEL, C.W. (1975) - Aging of human fibroblasts in vitro.
Correlations between DNA synthetic ability and cell size.
Exp. Cell Res. 93, 184-190.
- BRADLEY, M.O., HAYFLICK, L. et SCHIMKE, R.T. (1976) - Protein degradation in human fibroblasts (WI-38). Effects of aging, viral transformation and amino acid analogs.
J. Biol. Chem. 251, 3521-3529.
- BRANDES, D., MURPHY, D.G., ANTON, E.B. et BARNARD, S. (1972) - Ultrastructural and cytochemical changes in cultured human lung cells.
J. Ultrastruct. Res. 39, 465-483.
- BURROWS, R.B. et DAVISON, P.F. (1980) - Comparison of specific activities of enzymes from young and old dogs and mice.
Mech. Age.Dev. 13, 307-317.
- CANCEDDA, R., OGUNMOLA, G. et LUZZATTO, L. (1973) - Genetic variants of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. Discrete conformational states stabilized by NADP⁺ and NADPH.
Eur. J. Biochem. 34, 199-204.
- CAPASSO, J.M. et ZIMMERMAN, J.A. (1980) - Age - related alterations in the heat-stability of mouse heart phosphorylase.
Exp. Gerontol. 15, 161-165.
- CARREL, A. et EBELING, A.H. (1921)- Age and multiplication of fibroblasts.
J. Exp. Med. 34, 599-623.
- CARSON, P.E., SCHRIER, S.L. et KELLERMEYER, R.W. (1959) - Mechanism of inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes.
Nature 184, 1292-1293.
- CHEN, T.R. et RUDDLE, F.H. (1974) - Chromosome changes revealed by the Q-band staining method during cell senescence of WI-38.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147, 533-536.
- CHUNG, A.E. et LANGDON, R.G. (1963) - Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase.II. Enzyme-Coenzyme interrelationship.
J. Biol. chem. 238, 2317-2324.
- COHN, A.E. et MURRAY, H.A. (1925) - Physiological ontogeny.A. Chicken embryos.IV. The negative acceleration of growth with age as demonstrated by tissue cultures.
J. Exp. Med. 42, 275-290.
- COHEN, P. et ROSEMEYER, M.A. (1969) - Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes.
Eur. J. Biochem. 8, 8-15.

- COLEMAN, R., MICHELL, R.H., FINEAN, J.B. et HAWTHORNE, J.N. (1967)
A purified plasma membrane fraction isolated from rat liver
under isotonic conditions.
Biochim. Biophys. Acta 135, 573-579.
- CRISTOFALO, V.J. et KRITCHEVSKY, D. (1969) - Cell size and nucleic acid
content in the diploid human cell line WI-38 during aging.
Med. Exp. 19, 313-320.
- CRISTOFALO, V.J. (1970) - Metabolic aspects of aging in diploid human
cells.
Dans : Aging in cell and tissue culture.
Eds : E. Holečková et V.J. Cristofalo, Plenum Press, New-York
London, 83-119.
- CRISTOFALO, V.J. et SHARF, B.B. (1973) - Cellular senescence and DNA
synthesis : thymidine incorporation as a measure of popula-
tion age in human diploid cells.
Exp. Cell Res. 76, 419-427.
- CRISTOFALO, V.J. (1976) - Thymidine labelling index as a criterion of
ageing in vitro.
Gerontology 22, 9-27.
- DANIEL, C.W., DE OME, K.B., YOUNG, J.T., BLAIR, P.B. et FAULKIN, L.J.
(1968) - The *in vivo* life span of normal and preneoplastic
mouse mammary glands : a serial transplantation study.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 61, 53-60.
- DANIEL, C.W., YOUNG, J.T., MEDINA, D. et DE OME, K.B. (1971) - The
influence of mammogenic hormones on serially transplanted
mouse mammary gland.
Exp. Gerontol. 6, 95-101.
- DANIEL, C.W. (1975) - Regulation of cell division in ageing mouse
mammary epithelium.
Adv. Exp. Med. Biol. 61, 1-19.
- DEAMER, D.W. et GONZALES, J. (1974) - Autofluorescent structures in
cultured WI-38 cells.
Arch. Biochem. Biophys. 165, 421-426.
- de DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. et APPELMANS, F.
(1955) - Tissue fractionation studies - 6 - Intracellular
distribution patterns of enzymes in rat-liver tissues.
Biochem. J. 60, 604-617.
- de DUVE, C., WATTIAUX, R. et BAUDHUIN, P. (1962) - Distribution of
enzymes between subcellular fraction in animal tissues.
Adv. Enzymol 24, 291-358.

- DE FLORA, A., MORELLI, A. et GIULIANO, F. (1974)- Human erithrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase, content of bound coenzyme. Biochem. Biophys. Res. commun. 59, 406-413.
- DELL'ORCO, R.T. et GUTHRIE, P.L. (1976) - Altered protein metabolism in arrested populations of aging human diploid fibroblasts. Mech. Age.Dev. 5, 399-407.
- DIETZ, A.A. et LUBRANO, T. (1967) - Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis. Anal. Biochem. 20, 246-257.
- DILLARD, C.J. et TAPPEL, A.L. (1974) - β -Acetylhexosaminidase and other acid hydrolases of diploid WI-38 fibroblasts. Biochem. Med. 11, 275-289.
- DREYFUS, J.C., RUBINSON, H., SCHAPIRA, F., WEBER, A., MARIE, J. et KAHN, A. (1977) - Possible Molecular Mechanisms of ageing. Gerontology 23, 211-218.
- DREYFUS, J.C., KAHN, A. et SCHAPIRA, F. (1978) - Posttranslational modifications of enzymes.
Dans : Current topics in cellular regulation.
Eds : B. Horecker et Stadtman, Academic Press Inc. New York, San Francisco, London, 243-297.
- DUNCAN, M.R., DELL'ORCO, R.T. et GUTHRIE, P.L. (1977) - Relationship of heat labile glucose-6-phosphate dehydrogenase and multiple forms of the enzyme in senescent human fibroblasts. J. Cell. Physiol. 93, 49-56.
- DUNCAN, M.R. et DELL'ORCO, R.T. (1979) - Effects of the incorporation of p-fluorophenylalanine on the in vitro lifespan of human diploid cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161, 449-451.
- EMMELOT, P., BOS, C.J., BENEDETTI, E.L. et RUMKE, P.H. (1964) - Studies on plasma membranes I. Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver. Biochim. Biophys. Acta 90, 126-145.
- EPSTEIN, J. et GERSHON, D. (1972) - Studies on ageing in nematodes IV. The effect of antioxidants on cellular damage and life span.
Mech. Age.Dev. 1, 257-264.
- EPSTEIN, J., WILLIAMS, J.R. et LITTLE, J.B. (1973) - Deficient DNA repair in human progeroid cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 977-981.
- ERICKSON, R.P. (1974) - Erythrocytic nicotinamide-adenine dinucleotide levels and the genetic regulation of erythrocytic glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the inbred mouse. Biochem. Gen. 11, 33-40.

- EVANS, C.H. (1977) - Further evidence against the accumulation of altered enzymes in late passage embryonic mouse fibroblasts in vitro.
Exp. Gerontol. 12, 169-171.
- FLEISCHER, B. et FLEISCHER, S. (1970) - Preparation and characterization of Golgi membranes from rat liver.
Biochim. Biophys. Acta 219, 301-319.
- FOWLER, S., SHIO, H. et WOLINSKY, H. (1977) - Subcellular fractionation and morphology of calf aortic smooth muscle cells. Studies on whole aorta, aortic explants, and subcultures grown under different conditions.
J. Cell Biol. 75, 166-184.
- FULDER, S.J. (1979) - Evidence for an increase in presumed somatic mutation during the ageing of human cells in culture.
Mech. Age.Dev. 10, 101-115.
- GERSHON, H. et GERSHON, D. (1970) - Detection of inactive enzyme molecules in ageing organisms.
Nature 227, 1214-1217.
- GERSHON, H. et GERSHON, D. (1973a) - Altered enzyme molecules in senescent organisms: mouse muscle aldolase.
Mech. Age.Dev. 2, 33-41.
- GERSHON, H. et GERSHON, D. (1973b) - Inactive enzyme molecules in aging mice : liver aldolase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 909-913.
- GERSHON, D. et GERSHON, H. (1976)- An evaluation of the "error catastrophe" theory of ageing in the light of recent experimental results.
Gerontology 22, 212-219.
- GERSHON, D. (1979) - Current status of age altered enzymes : alternative mechanisms.
Mech. Age.Dev. 9, 189-196.
- GIRARDI, A.J., JENSEN, F.C. et KOPONSKY, H. (1965) - SV-40-induced transformation of human diploid cells. Crisis and recovery.
J. Cell. Comp. Physiol. 65, 69-78.
- GOLDBERG, A.L. (1972)- Degradation of abnormal proteins in Escherichia Coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 422-426.
- GOLDSTEIN, S. et SINGAL, D.P. (1974) - Alteration of fibroblasts gene products in vitro from subject with Werner's syndrome.
Nature 251, 719-721.
- GOLDSTEIN, S. (1974) - Aging in vitro : growth of cultured cells from the galapagos tortoise.
Exp. Cell Res. 83, 297-302.

- GOLDSTEIN, S. et MOERMAN, E. (1975a) - Heat - labile enzymes in skin fibroblasts from subjects with progeria.
New Engl. J. Med. 292, 1305-1309.
- GOLDSTEIN, S. et MOERMAN, E.J. (1975b) - Heat - labile enzymes in Werner's syndrome fibroblasts.
Nature 255, 159.
- GOLDSTEIN, S., STOTLAND, D. et CORDEIRO, R.A.J. (1976) - Decreased proteolysis and increased amino acid efflux in aging human fibroblasts.
Mech. Age.Dev. 5, 221-233.
- GOLDSTONE, A., KONECNY, P. et KOENIG, H. (1971) - Lysosomal hydrolases : conversion of acidic to basic forms by neuraminidase.
FEBS Letters 13, 68-72.
- GORDON, P. (1974) - Free radicals and the aging process.
Dans : Theoretical aspects of aging.
Eds: M. Rockstein, M.L. Sussman et J. Chesky, Academic Press, Inc., New-York, San Francisco, London, 61-103.
- GOREN, P., REZNICK, A.Z., REISS, U. et GERSHON, D. (1977) - Isoelectric properties of nematode aldolase and rat liver superoxide dismutase from young and old animals.
FEBS Letters 84, 83-86.
- GRAFF, G., STEPHENSON, J.H., GLASS, D.B., HADDOX, M.K. et GOLDBERG, N.D. (1978) - Activation of soluble splenic cell guanylate cyclase by prostaglandin endoperoxides and fatty acid hydroperoxides.
J. Biol. Chem. 253, 7662-7676.
- GREEN, R.C., LITTLE, C. et O'BRIEN, P.J. (1971) - The inactivation of isocitrate dehydrogenase by a lipid peroxyde.
Arch. Biochem. Biophys. 142, 598-605.
- GRINNA, L.S. et BARBER, A.A. (1975) - Age related thermolability of liver and kidney glucose-6-phosphatase.
Exp. Gerontol. 10, 239-240.
- GROVE, G.L. et CRISTOFALO, V.J. (1977) - Characterization of the cell cycle of cultured human diploid cells : effects of aging and hydrocortisone.
J. Cell. Physiol. 90, 415-422.
- GUPTA, S.K. et ROTHSTEIN, M. (1976a) - Triose phosphate isomerase from young and old Turbatrix aceti.
Arch. Biochem. Biophys. 174, 333-338.
- GUPTA, S.K. et ROTHSTEIN, M. (1976b) - Phosphoglycerate kinase from young and old Turbatrix aceti.
Biochim. Biophys. Acta 445, 632-644.

- HALLIWELL, B. (1978) - Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms : the key role of superoxide dismutase.
Cell. Biol. Int. Reports. 2, 113-128.
- HARDING, J.J. (1973) - Altered heat-lability of a fraction of glutathione reductase in aging human lens.
Biochem. J. 134, 995-1000.
- HARRISSON, D.E. (1975) - Normal function of transplanted marrow cell lines from aged mice.
J. Gerontol. 30, 279-285.
- HAYFLICK, L. et MOORHEAD, P.S. (1961) - The serial cultivation of human diploid cell strains.
Exp. Cell Res. 25, 585-621.
- HAYFLICK, L. (1965) - The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.
Exp. Cell Res. 37, 614-636.
- HAYFLICK, L. SCHWARTZ, B.D., SMITH, J.R., STEIN, G.H. et WRIGHT, W.E. (1973) - Investigations into the causes of senescence in cultured normal human diploid cells.
I.N.S.E.R.M. 27, 3-28.
- HAYFLICK, L. (1974) - The longevity of cultured human cells.
J. Am. Ger. Soc. 22, 1-12.
- HAYFLICK, L. (1980) - Recent advances in the cell biology of aging.
Mech. Age.Dev. 14, 59-79.
- HIZI, A. et YAGIL, G. (1974) - On the mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation in mouse liver. 2. Purification and properties of the mouse liver enzyme.
Eur. J. Biochem. 45, 201-209.
- HOLLAND, J.J., KOHNE, D. et DOYLE, M.V. (1973) - Analysis of virus replication in ageing human fibroblasts cultures.
Nature 245, 316.
- HOLLIDAY, R. et TARRANT, G.M. (1972) - Altered enzymes in ageing human fibroblasts.
Nature 238, 26-30.
- HOLLIDAY, R., PORTERFIELD, J.S. et GIBBS, D.D. (1974) - Premature ageing and occurrence of altered enzyme in Werner's syndrome fibroblasts.
Nature 248, 762-763.
- HOLLIDAY, R. (1975) - Testing the protein error theory of aging : a reply to Baird, Samis, Massie and Zimmerman.
Gerontologia 21, 64-68.

- HOLLIDAY, R., HUSCHTSCHA, L.I., TARRANT, G.M., KIRKWOOD, T.B.L.
(1977) - Testing the commitment theory of cellular aging.
Science 198, 366-372.
- HOLTEN, D. (1972) - Relationships among the multiple molecular forms
of rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase.
Biochim. Biophys. Acta 268, 4-12.
- HOUBEN, A. et REMACLE, J. (1978) - Lysosomal and mitochondrial heat
labile enzymes in ageing human fibroblasts.
Nature 275, 59-60.
- HOUBEN, A., HOUBION, A. et REMACLE, J. (1980) - Short communication :
Lysosomal and mitochondrial heat labile enzymes in Werner's
syndrome fibroblasts.
Exp. Gerontol. 15, 629-631.
- KAHN, A., MEIENHOFER, M.C., VIBERT, M. et DREYFUS, J.C. (1973) -
Vieillissement moléculaire de la glucose-6-phosphate déshy-
drogénase humaine.
I.N.S.E.R.M. 27, 129-138.
- KAHN, A., BOIVIN, P., VIBERT, M., COTTREAU, D. et DREYFUS, J.C. (1974)
Post-translational modifications of human glucose-6-phosphate
dehydrogenase.
Biochimie 56, 1395-1407.
- KAHN, A., et DREYFUS, J.C. (1974) - Purification of glucose -6-phosphate
dehydrogenase from red blood cells and from human leucocytes.
Biochim. Biophys. Acta 334, 257-265.
- KAHN, A., COTTREAU, D., BERNARD, J.F. et BOIVIN, P. (1975) - Post-
translational modifications of glucose-6-phosphate dehydro-
genase in human leukemias.
Biomedicine 22, 539-594.
- KAHN, A., BERTRAND, O., COTTREAU, D., BOIVIN, P. et DREYFUS, J.C. (1976a) -
Studies on the nature of different molecular forms of glucose-
6-phosphate dehydrogenase purified from human leucocytes.
Biochim. Biophys. Acta 445, 537-548.
- KAHN, A., BOIVIN, P., RUBINSON, H., COTTREAU, D., MARIE, J. et
DREYFUS, J.C. (1976b) - Modifications of purified glucose-6-
phosphate dehydrogenase and other enzymes by a factor of low
molecular weight abundant in some leukemic cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 77-81.
- KAHN, A., GUILLOUZO, A., LEIBOVITCH, M.P., COTTREAU, D., BOUREL, M.
et DREYFUS, J.C. (1977a) - Heat lability of glucose-6-phosphate
dehydrogenase in some senescent human cultured cells.
Evidence for its postsynthetic nature.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 760-766.

- KAHN, A., GUILLOUZO, A., COTTREAU, D., MARIE, J., BOUREL, M., BOIVIN, P. et DREYFUS, J.C. (1977b) - Accuracy of protein synthesis and in vitro aging. Search for altered enzymes in senescent cultured cells from human livers. Gerontology 23, 174-184.
- KAHN, A., BERTRAND, O., COTTREAU, D., BOIVIN, P. et DREYFUS, J.C. (1977c) - Evidence for structural differences between human glucose-6-phosphate dehydrogenase purified from leucocytes and erythrocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 65-72.
- KAHN, A., VIBERT, M., COTTREAU, D., SKALA, H. et DREYFUS, J.C. (1978) - Hyperanodic forms of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 526, 318-327.
- KAJI, H., HARA, H. et LAMON, K.D. (1980) - Fixation of cellular aging processes by SV40 virus transformation. Mech. Age.Dev. 12, 197-209.
- KANUNGO, M.S. (1980) - Biochemistry of ageing. Academic Press, London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco, 281 pp.
- KARN, R.C., SHULKIN, J.D., MERRITT, A.D. et NEWELL, R.C. (1973) - Evidence for post-transcriptional modification of human salivary amylase (amy₁) isozymes. Biochem. Genet. 10, 341-350.
- KIRKMAN, H.N. (1962) - Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. I. Further purification and characterization. J. Biol. Chem. 237, 2364-2370.
- KIRKMAN, H.N. et HENDRICKSON, E.M. (1962) - Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. II. Subactive states of the enzyme from normal persons. J. Biol. Chem. 237, 2371-2376.
- KLEFENZ, F.K. (1978) - Review : a comparative analysis of studies of enzyme changes with age, with comments on possible sources of error. Age 1, 60-67.
- KLINGENBERG, M. (1974) - Nicotinamide - adenine dinucleotides (NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH). Spectrophotometric and fluorimetric methods. Dans : Methods of enzymatic analysis. Ed : H.V. Bergmeyer. Verlag Weinheim , Academic Press. Inc., New York, San Francisco, London . 2045-2072.

- KRITCHEVSKY, D. et HOWARD, B.V. (1970) - Lipid metabolism in human diploid cells.
Dans : Aging in cell and tissue culture.
Eds : E. Holečková et V.J. Cristofalo, Plenum Press,
New York - London, 57-82.
- LAMB, M.J. (1977) - Tertiary level biology. Biology of ageing.
Blackie, Glasgow , London , 184 pp.
- LANGRIDGE, J. (1968) - Thermal responses of mutant enzymes and temperature limits to growth.
Mol. Gen. Genet. 103, 116-126.
- LEIBOVITZ, B.E. et SIEGEL, B.V. (1980) - Aspects of free radicals reactions in biological systems : aging.
J. Gerontol. 35, 45-56.
- LEJEUNE, N., THINES-SEMPOUX, D. et HERS, H.G. (1963) - Tissue fractionation studies. 16. Intracellular distribution and properties of α -glucosidases in rat liver.
Biochem. J. 86, 16-21.
- LERAY, G., GUENET, L., LE TREUT, A. et LE GALL, J.Y. (1981) - Age - related decrease in lysosomal β -D-galactosidase activity of human liver cell lines : argument against post-traductional modifications.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 1491-1496.
- LEWIS, C.M. et TARRANT, G.M. (1972) - Error theory and ageing in human diploid fibroblasts.
Nature 239, 316-318.
- LEWIS, C.M. et HOLLIDAY, R. (1970) - Mistranslation and ageing in Neurospora.
Nature, 228, 877-880.
- LIMA, L., MALAISE, E. et MACIEIRA-COELHO (1972) - Effect of low dose rate irradiation on the division potential of chick embryonic fibroblasts.
Exp. Cell Res. 73, 345-350.
- LINN, S., KAIRIS, M. et HOLLIDAY, R. (1976) - Decreased fidelity of DNA polymerase activity isolated from aging human fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 2818-2822.
- LIPETZ, J. et CRISTOFALO, J. (1972) - Ultrastructural changes accompanying the aging of human diploid cells in culture.
J. Ultrastruct. Res. 39, 43-56.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., et RANDALL, R.J. (1951) - Protein measurement with Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275.

- MACIEIRA-COELHO, A., PONTEN, J. et PHILIPSON, L. (1966) - The division cycle and RNA synthesis in diploid human cells at different passage levels in vitro.
Exp. Cell Res. 42, 673-684.
- MACIEIRA-COELHO, A. (1966) - Action of cortisone on human fibroblasts in vitro.
Experientia 22, 390-391.
- MACIEIRA-COELHO, A. et LORIA, E. (1973) - Effet stimulateur de l'hydrocortisone sur la synthèse des ribosomes des fibroblastes in vitro.
I.N.S.E.R.M. 27, 93-100.
- MACIEIRA-COELHO, A. et LORIA, E. (1974) - Stimulation of ribosome synthesis during retarded ageing of human fibroblasts by hydrocortisone.
Nature 251, 67-69.
- MACIEIRA-COELHO, A. (1974) - Are non-dividing cells present in ageing cell culture.
Nature 248, 421-422.
- MACIEIRA-COELHO, A. (1976) - Introduction.
Gerontology 22, 3-8.
- MACIEIRA-COELHO, A., DIATLOFF, C. et MALAISE, E. (1976) - Doubling potential of fibroblasts from different species after ionising radiation.
Nature 261, 586-588.
- MACIEIRA-COELHO, A., DIATLOFF, C. et MALAISE, E. (1977) - Concept of fibroblast ageing in vitro; implications for cell biology.
Gerontology 23, 290-305.
- MAINFERME, F. et WATTIAUX, R. (1980) - Modification d'origine protéolytique de la catalase de foie de rat.
Arch. Int. Physiol. Biochim. 88, 88-89.
- MARKS, P.A., SZEINBERG, A. et BANKS, J. (1961) - Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase of normal and mutant human subjects.
J. Biol. Chem. 236, 10-17.
- MARTIN, G.M., CURTIS, A., SPRAGUE, B.S. et EPSTEIN, C.J. (1970) - Replicative life - span of cultivated human cells.
Lab. Invest. 23, 86-92.
- MATTHEWS, O., BRADLEY, M.O., SCHIMKE, R.T. et HAYFLICK, L. (1975) - Protein degradation in aging WI-38 fibroblasts.
Fed. Proc. 34, 278.

- MENNECIER, F. et DREYFUS, J.C. (1974) - Molecular aging of fructose biphosphate aldolase in tissues of rabbit and man.
Biochim. Biophys. Acta 364, 320-326.
- MITSUI, Y. et SCHNEIDER, E.L. (1976) - Relationship between cell replication and volume in senescent human diploid fibroblasts.
Mech. Age.Dev. 5, 45-56.
- MÖRIKOFER-ZWEZ, S., CANTZ, M., KAUFMANN, H., VON WARTBURG, J.P. et AEBI, H. (1969) - Heterogeneity of erythrocyte catalase. Correlations between sulphhydryl group content, chromatographic and electrophoretic properties.
Eur. J. Biochem. 11, 49-57.
- MORRE, D.J., MERLIN, L.M. et KEENAM, T.W. (1969) - Localization of glycosyl transferase activities in a Golgi apparatus-rich fraction isolated from rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 813-819.
- MUNKRES, K.D. et MINSEN, M. (1976) - Ageing of Neurospora crassa. I. Evidence for the free radical theory of ageing from studies of a natural death mutant.
Mech. Age.Dev. 5, 79-98.
- MUNKRES, K.D. (1976) - Aging of Neurospora crassa. Induction of senescence in wild type by dietary amino acid analogs and reversal by antioxydants and membrane stabilizers.
Mech. Age. Dev. 5, 171-191.
- MUNNELL, J.F. et GETTY, R. (1968) - Rate of accumulation of cardiac lipofuscin in the aging canine.
J. Gerontol. 23, 154-158.
- OLIVEIRA, R.J. et PFUDERER, P. (1973) - Test for missynthesis of lactate dehydrogenase in aging mice by use of monospecific antibody.
Exp. Gerontol. 8, 193-198.
- ORGEL, L.E. (1963) - The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 49, 517-521.
- ORGEL, L.E. (1973) - Ageing of clones of mammalian cells.
Nature 243, 441-445.
- PACKER, L. et SMITH, J.R. (1974) - Extension of the lifespan of cultured normal human diploid cells by vitamin E.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4763-4767.

- PACKER, L. et SMITH, J.R. (1977) - Extension of the lifespan of cultured normal human diploid cells by vitamin E : a reevaluation.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 74, 1640-1641.
- PENDERGRASS, W.R., MARTIN, M.G. et BORNSTEIN, P. (1976) - Evidence contrary to the protein error hypothesis in vitro senescence.
J. Cell. Physiol. 87, 3-13.
- PRICE, G.B., MODAK, S.P. et MAKINODAN, T. (1971) - Age - associated changes in the DNA of mouse tissues.
Science 171, 917-920.
- RATTAZZI, M.C. (1968) - Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes : molecular weight determination by gel filtration.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 16-24.
- REISS, U. et ROTHSTEIN, M. (1974) - Heat - labile isozymes of isocitrate lyase from aging Turbatrix aceti.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 1012-1016.
- REISS, U. et ROTHSTEIN, M. (1975) - Age - related changes in isocitrate lyase from the free living nematode Turbatrix aceti.
J. Biol. Chem. 250, 826-830.
- REISS, U. et GERSHON, D. (1976a) - Rat - liver superoxide dismutase. Purification and age-related modifications.
Eur. J. Biochem. 63, 617-623.
- REISS, U. et GERSHON, D. (1976b) - Comparison of cytoplasmic superoxide dismutase in liver, heart and brain of aging rats and mice.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 255-262.
- REMACLE, J.A., HOUBION, A. et HOUBEN, A. (1980) - Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts. Comparison between young and old cells.
Biochim. Biophys. Acta 630, 57-70.
- REZNICK, A.Z. et GERSHON, D. (1977) - Age-related alterations in purified fructose -1,6-diphosphate aldolase from the nematode Turbatrix aceti.
Mech. Age. Dev. 6, 345-353.
- REZNICK, A.Z., LAVIE, L., GERSHON, H.E. et GERSHON, D. (1981) - Age - associated accumulation of altered FDP aldolase B in mice. Conditions of detection and determination of aldolase half life in young and old animals.
FEBS Letters 128, 221-224.

- ROBINSON, D. et STIRLING, J.L. (1968) - N-acetyl- β -glucosaminidase in human spleen.
Biochem. J. 107, 321-327.
- ROBINSON, A.B., McKERROW, J.H. et CARY, P. (1971) - Controlled deamidation of peptides and proteins : an experimental hazard and a possible biological timer.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 66, 753-757.
- ROBINSON, A. (1974) - Evolution and the distribution of glutamyl and asparagyl residues in proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 885-888.
- ROBINSON, A.B. (1979) - Molecular clocks, molecular profiles and optimum diets; three approaches to the problem of aging.
Mech. Age. Dev. 9, 225-236.
- ROTHSTEIN, M. (1975) - Aging and the alteration of enzymes : a review.
Mech. Age. Dev. 4, 325-338.
- ROTHSTEIN, M. (1977) - Recent developments in the age-related alteration of enzymes : a review.
Mech. Age. Dev. 6, 241-257.
- ROTHSTEIN, M. (1979) - The formation of altered enzymes in aging animals.
Mech. Age. Dev. 9, 197-202.
- RUBINSON, H., KAHN, A., BOIVIN, P., SCHAPIRA, F., GREGORI, C. et DREYFUS, J.C. (1976) - Aging and accuracy of protein synthesis in man : search for inactive enzymatic cross-reacting material in granulocytes of aged people.
Gerontology 22, 438-448.
- RYAN, J.M., DUDA, G. et CRISTOFALO, V.J. (1974) - Error accumulation and aging in human diploid cells.
J. Gerontol. 29, 616-621.
- RYAN, J.M. et CRISTOFALO, V.J. (1979) - Hydrocortisone - dependent alterations of transcriptional activity in WI-38 cells.
Exp. Cell Res. 122, 179-184.
- SAKSELA, E. et MOORHEAD, P.S. (1963) - Aneuploidy in the degenerative phase of serial cultivation of human cell strains.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 50, 390-395.
- SCHAPIRA, F., WEBER, A. et GREGORI, C. (1975) - Vieillesse de la lactico-déshydrogénase hépatique du rat et renouvellement cellulaire.
Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 280, 1161-1163.

- SCHERZ, B., KUCHINSKAS, E.J., WYSS, S.R. et AEBI, H. (1976) - Heterogeneity of erythrocyte catalase. Dissociation, recombination and hybridization of human erythrocyte catalase.
Eur. J. Biochem. 69, 603-613.
- SCHNEIDER, E.L. et FOWLKES, B.J. (1976) - Measurement of DNA content and cell volume in senescent human fibroblasts utilizing flow multiparameter single cell analysis.
Exp. Cell Res. 98, 298-302.
- SCHNEIDER, E.L. et MITSUI, Y. (1976) - The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3584-3588.
- SCHOFIELD, J.D. et HADFIELD, J.M. (1978) - Age-related alterations in the heat-lability of mouse liver glucose-6-phosphate dehydrogenase.
Exp. Gerontol. 13, 147-157.
- SELLINGER, O.Z., BEAUFAY, H., JACQUES, P., DOYEN, A. et de DUVE, C. (1960) - Tissue fractionation studies. 15. Intracellular distribution and properties of β -N-acetyl-glucosaminidase and β -galactosidase in rat liver.
Biochem. J. 74, 450-456.
- SHAKESPEARE, V. et BUCHANAN, J.H. (1978) - Studies on phosphoglucose isomerase from cultured human fibroblasts : absence of detectable ageing effects on the enzyme.
J. Cell. Physiol. 94, 105-116.
- SHARMA, H.K., GUPTA, S.K. et ROTHSTEIN, M. (1976) - Age-related alteration of enolase in the free-living nematode Turbatrix aceti.
Arch. Biochem. Biophys. 174, 324-332.
- SHARMA, H.K. et ROTHSTEIN, M. (1978) - Serological evidence for the alteration of enolase during aging.
Mech. Age. Dev. 8, 341-354.
- SHARMA, H.K. et ROTHSTEIN, M. (1980) - Altered enolase in aged Turbatrix aceti results from conformational changes in the enzyme.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 5865-5868.
- SHELDRAKE, A.R. (1974) - The ageing, growth and death of cells.
Nature 250, 381-385.
- SKALA, H., VIBERT, M., KAHN, A. et DREYFUS, J.G. (1979) - Phospho-ADP ribosylation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase : probable mechanism of the occurrence of hyperanodic forms.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 988-996.

- SMITH, J.R. et HAYFLICK, L. (1974) - Variation in the life-span of clones derived from human diploid cell strains.
J. Cell Biol. 62, 48-53.
- SMITH, J.R. et WHITNEY, R.G. (1980) - Intraclonal variation in proliferative potential of human diploid fibroblasts : stochastic mechanism for cellular aging.
Science 207, 82-84.
- SOMVILLE, M. et REMACLE, J. (1980) - Superoxide dismutases in ageing human fibroblasts.
Dans : Biological and clinical aspects of superoxide and superoxide dismutase.
Eds : W.H. Bannister et J.V. Bannister. Elsevier North-Holland.
- SOUKUPOVÁ, M. et HOLEČKOVÁ, E. (1964) - The latent period of explanted organs of newborn, adult and senile rats. Exp. Cell Res. 33, 361-367.
- SOUKUPOVÁ, M., HOLEČKOVÁ, E. et HNEVĚKOVSKÝ, P. (1970) - Changes of the latent period of explanted tissues during ontogenesis.
Dans : Aging in cell and tissue culture.
Eds : E. Holečková et V.J. Cristofalo - Plenum Press, New York, London, 41-56.
- STANLEY, J.F., PYE, D. et MAC GREGOR, A. (1975) - Comparison of doubling numbers attained by cultured animal cells with life span of species.
Nature 255, 158-159.
- STEINHAGEN-THIESSEN, E. et HILZ, H. (1976) - The age-dependent decrease in creatine kinase and aldolase activities in human striated muscle is not caused by an accumulation of faulty proteins.
Mech. Age. Dev. 5, 447-457.
- STEINHAGEN-THIESSEN, E. et HILZ, H. (1979) - Aldolase activity and cross reacting material in lymphocytes of aged individuals.
Gerontology 25, 132-135.
- STREHLER, B.L., MARK, D.D., MILDVAN, A.S. et GEE, M.V. (1959) - Rate and magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium.
J. Gerontol. 14, 430-499.
- STREHLER, B.L. (1967) - The nature of cellular age changes.
Symp. Soc. Exp. Biol. 21, 149-177.
- THOMPSON, K.V.A. et HOLLIDAY, R. (1975) - Chromosome changes during the in vitro ageing of MRC-5 human fibroblasts.
Exp. Cell Res. 96, 1-6.
- THOMPSON, K.V.A. et HOLLIDAY, R. (1978) - The longevity of diploid and polyploid human fibroblasts.
Exp. Cell Res. 112, 281-287.

- TODARO, G.J. et GREEN, H. (1963) - Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines.
J. Cell Biol. 17, 299-313.
- TODARO, G.J. et GREEN, H. (1964) - Serum albumin supplemented medium for longterm cultivation of mammalian fibroblast strains.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116, 688-692.
- TOMKINS, G.A., STANBRIDGE, E.J. et HAYFLICK, L. (1974) - Viral probes of aging in the human diploid strain WI-38.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146, 385-390.
- TULKENS, P., BEAUFAY, H. et TROUET, A. (1974) - Analytical fractionation of homogenates from cultured rat embryo fibroblasts.
J. Cell Biol. 63, 383-401.
- TROUET, A., TULKENS, P. et SCHNEIDER, Y.J. (1974) - Uptake and intracellular fate of antilyosome and antiplasma membrane antibodies in cultured fibroblasts.
Dans : Enzyme therapy in lysosomal storage diseases.
Eds : J.M. Tager, G.J.M. Hooghwinkel and W.Th. Daems, North Holland. Publ. Co., Amsterdam, 277-281.
- VAN GANSEN, P., DEVOS, L., OZORAN, Y. et ROXBURGH, C. (1979) - Phénotypes des fibroblastes d'embryons de souris vieillissant in vitro (SEM et TEM).
Biol. Cell. 34, 255-270.
- VAN HOOF, F. (1972) - Les mucopolysaccharidases en tant que thésaurismoses lysosomiales. Thèse Louvain. Belgique.
Vander 285 pp.
- VICEPS-MADORE, D. et CRISTOFALO, V.J. (1978) - Age - associated changes in glutamine synthetase activity in WI-38 cells.
Mech. Age. Dev. 8, 43-50
- WANG, K.M., ROSE, N.R., BARTHOLOMEW, E.A., BALZER, M., BERDE, K. et FOLDVARY, M. (1970) - Changes of enzymatic activities in human diploid cell line WI-38 at various passages.
Exp. Cell Res. 61, 357-364.
- WATTIAUX - DE CONNINCK, S. et WATTIAUX, R. (1971) - Subcellular distribution of sulfite cytochrome c reductase in rat liver tissue.
Eur. J. Biochem. 19, 552-556.
- WEBER, A., GREGORI, C. et SCHAPIRA, F. (1976) - Aldolase B in the liver of senescent rats.
Biochim. Biophys. Acta 444, 810-815.

- WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S., BOHLEY, P., KIRSCHKE, H., LANGNER, J. et HANSON, H. (1978) - The age dependence of intracellular proteolysis : changes of the substrate proteins. *Mech. Age. Dev.* 8, 355-362.
- WOLOSEWICK, J.J. et PORTER, K.R. (1976) - Observations on the morphological heterogeneity of WI-38 cells. *Am. J. Anat.* 149, 197-226.
- WULF, J.H. et CUTLER, R.G. (1975) - Altered protein hypothesis of mammalian ageing processes. I. Thermal stability of glucose-6-phosphate dehydrogenase in C57BL/GJ mouse tissue. *Exp. Gerontol.* 10, 101-117.
- YAGIL, G. (1976) - Are altered glucose-6-phosphate dehydrogenase molecules present in aged liver cells. *Exp. Gerontol.* 11, 73-78.
- YOSHIDA, A., BUETLER, E. et MOTULSKY, A.G. (1971) - Table of human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. Dans : *Mendelian Inheritance in Man*. Ed . : V.A. McKusick, Johns Hopkins University Press, Baltimore 565a-565p.
- ZEELON, P., GERSHON, H. et GERSHON, D. (1973) - Inactive enzyme molecules in aging organisms. Nematode fructose-1,6-diphosphate aldolase. *Biochemistry* 12, 1743-1750.

BUMP



0 0 1 7 1 1 1 4 4

*FT B03/1981/01

